INTERAKTION VON LEKTINEN AUS PHASEOLUS LUNATUS MIT LYMPHOZYTHEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
HILDEGARD KRAUT
aus Altenmittlau
(jetzt Freigericht)

1978

1979

INTERAKTION VON LEKTINEN AUS PHASEOLUS LUNATUS MIT LYMPHOZYTHEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
HILDEGARD KRAUT
aus Altenmittlau
(jetzt Freigericht)

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	10. August 1978
D e k a n :	Prof. Dr. K. P. Hadeler
1. Berichterstatter	Prof. Dr. V. Braun
2. Berichterstatter	Dozent Dr. W. Bessler

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Volkmar Braun am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die jederzeit großzügige Unterstützung und die wertvollen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. Volkmar Braun und Herrn Dozent Dr. Wolfgang Bessler.

Für wertvolle Diskussionen und Unterstützung danke ich den Mitgliedern der gesamten Arbeitsgruppe.

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Abkürzungen verwendet:

Abb.	Abbildung
βPSG	2-Mercaptoäthanol, Penicillin, Streptomycin, Glutamin
Carbodiimid	1-Äthyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
CCRF-CEM Zellen	Childrens' Cancer Research Foundation - CEM Zellen
CEM Zellen	CCRF-CEM Zellen
ConA	Concanavalin A
cpm	counts per minute
DNS	Desoxyribonucleinsäure
El.	Eluat
FKS	Fötales Kälberserum
Fr.	Fraktion
GalN	Galaktosamin
GalNac	N-Acetyl-D-Galaktosamin
HA-Test	Hämagglutinationstest
IgG	Immunglobulin G
LcA	Lens culinaris Agglutinin
LPS	Lipopolysaccharid
MEM	Minimum Essential Medium, Eagle modifiziert, mit Hanks' Salzen, 20 mM Hepes Puffer, ohne $NaHCO_3$, ohne Glutamin
NP 40	Nonidet P 40
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Saline)
PHA	Phytohämagglutinin
p.M.	persönliche Mitteilung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPD	Purified Protein Derivative of Tuberculin
PWM	Pokeweed Mitogen
RCA	Ricinus communis Agglutinin
RNS	Ribonucleinsäure
RPMI 1640	Züchtungsmedium (entwickelt: Roswell Park Memorial Institute)
RSA	Rinderserumalbumin
$S_{20,W}$	Sedimentationskonstante
SBA	Sojabohnen Agglutinin

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SI	Stimulations-Index
Stim. Max.	Stimulations Maximum
TCA	Trichloressigsäure
TKM-Puffer	Tris-Puffer
TMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
WGA	Wheat Germ Agglutinin

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0063

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	PROBLEMSTELLUNG	7
3.	MATERIAL UND METHODEN	9
3.1.	Material	9
3.1.1.	Puffer, Medien und Medienzusätze	9
3.1.2.	Lektine	11
3.1.3.	Versuchstiere	11
3.1.4.	Chemikalien, Säulenmaterial	12
3.1.5.	Säulen, Synthesen, Charakteristika	14
3.1.5.1.	Kopplung von Galaktosamin an CH-Sepharose 4 B	14
3.1.5.2.	Kopplung von Limabohnenlektin an CNBr-aktivierte Sepharose 4 B	14
3.1.5.3.	Kopplung von Limabohnenlektin an Epoxy-aktivierte Sepharose 6 B	15
3.1.5.4.	ConA-Sepharose (Pharmacia)	16
3.1.5.5.	Sephadex G 200 superfine Säule (Pharmacia)	17
3.2.	Methoden	18
3.2.1.	Isolation der Limabohnenlektine	18
3.2.1.1.	Mechanischer Aufschluß der Limabohnen (Phaseolus lunatus)	18
3.2.1.2.	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	18
3.2.1.3.	Affinitätschromatographische Reinigung der Limabohnenlektine an ConA-Sepharose 4 B	19
3.2.1.4.	Affinitätschromatographische Reinigung der Limabohnenlektine an GalN-Sepharose 4 B	19
3.2.1.5.	Trennung der Limabohnenlektine an einer Sephadex G 200 superfine Säule	20
3.2.2.	Reinheitskontrollen der Limabohnenlektine	20
3.2.2.1.	SDS Gelelektrophorese nach Laemmli	20
3.2.2.2.	Isoelektrische Fokussierung nach Vesterberg	20
3.2.2.3.	Analytische Ultrazentrifugation	21
3.2.2.4.	Aminosäurenanalyse der Limabohnenlektine nach der Molekulargewichtstrennung	22
3.2.2.5.	Diffusionstest nach Ouchterlony	24

		Seite
3.2.3.	Reinigung einer Antikörperfraktion gegen Lima 247	24
3.2.3.1.	Herstellung gereinigter Antikörper	24
3.2.3.2.	Reinheitskontrolle der Antikörperfraktion	25
3.2.4.	Hämagglutinationstest mit Limabohnenlektinen	26
3.2.4.1.	Hämagglutination	26
3.2.4.2.	Inhibition der Hämagglutination	26
3.2.5.	Stimulationsexperimente von Lymphozyten mit Limabohnenlektinen	27
3.2.5.1.	Stimulation von Rattenlymphozyten	27
3.2.5.2.	Stimulation von Humanlymphozyten	29
3.2.5.3.	Aufarbeitung der Zellkulturen nach der Stimulation	30
3.2.5.4.	Vitalitätstest der Zellen mit Trypanblau	30
3.2.6.	Isolation der Rezeptorproteine für die Limabohnenlektine	31
3.2.6.1.	Jodierung der Zellen nach Marchalonis et al.	31
3.2.6.2.	Solubilisierung der jodierten Membranproteine	32
3.2.6.3.	Immunpräzipitation der solubilisierten jodierten Membranproteine	32
3.2.6.4.	Enzymatischer Abbau des markierten Zellsolubilisats	33
3.2.6.5.	Isolation der Limabohnenrezeptorsubstanz durch Affinitätschromatographie an Lima-Sepharose 6 B	34
3.2.6.6.	Vorbereitung der Proben für die SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli	35
3.2.6.7.	Inhibitionen mit Rezeptorprotein von CCRF-CEM Zellen	35
3.2.7.	Proteinbestimmungen	36
3.2.7.1.	Proteinbestimmungen durch Messung der optischen Dichte von Proteinlösungen bei 280 nm	36
3.2.7.2.	Proteinbestimmungen nach Lowry	37
3.2.8.	Färbung der Polyacrylamidgele	37
3.2.9.	Autoradiographie jodierter Membranproteine	38

		Seite
4.	ERGEBNISSE	39
4.1.	Isolation der Limabohnenlektine	39
4.2.	Reinheitskontrollen	45
4.2.1.	SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli	45
4.2.2.	Isoelektrische Fokussierung der Isolektine	49
4.2.3.	Analytische Ultrazentrifugation	51
4.2.4.	Aminosäurenanalyse gereinigter Limabohnen-Isolektine nach affinitätschromatographischer Reinigung an ConA-Sepharose und GalN-Sepharose	55
4.2.5.	Ouchterlony-Diffusionstest der Limabohnen-Isolektine gegen anti-Lima-247-Antiserum vom Kaninchen	59
4.3.	Isolation und Reinigung eines Antiserums gegen Lima 247	60
4.3.1.	Affinitätschromatographische Reinigung der Antikörperfraktion mit Lima-Sepharose 4 B	61
4.3.2.	SDS-Gelelektrophorese des Antiserums und der gereinigten Antikörper gegen Lima 247	62
4.3.3.	Ouchterlony-Diffusionstest der gereinigten und ungereinigten Antiserumfraktionen	63
4.4.	Hämagglutinationstest mit Limabohnen-Isolektinen	65
4.4.1.	Hämagglutination von Erythrozyten mit Limabohnen-Isolektinen	65
4.4.2.	Inhibition der Agglutination mit N-Acetyl-D-Galaktosamin	66
4.5.	Stimulationsexperimente mit Limabohnen-lektinen	67
4.5.1.	Stimulation von Rattenlymphozyten	67
4.5.1.1.	Markierung der Zellen mit ^{3}H-Thymidin	67
4.5.1.2.	Markierung der Zellen mit ^{3}H-Leucin	67
4.5.1.3.	Markierung der Zellen mit ^{3}H-Uridin	68
4.5.2.	Stimulation von Humanlymphozyten	71
4.5.2.1.	Markierung der Zellen mit ^{3}H-Thymidin	71
4.5.2.1.1.	Aufnahme von Dosis-Wirkungskurven zu verschiedenen Zeiten nach Mitogenzugabe	71
4.5.2.1.2.	Vergleich der Mitogenität der Limabohnen-Isolektine	74

		Seite
4.5.2.1.3.	Markierung gereinigter B und T Zellen nach der Stimulation mit Lima poly I + II	77
4.5.2.2.	Markierung der Zellen mit ^{3}H-Leucin	79
4.5.2.3.	Markierung der Zellen mit ^{3}H-Uridin	80
4.5.2.4.	Inhibition der Stimulation von Humanlymphozyten mit N-Acetyl-D-Galaktosamin	81
4.6.	Isolation der Rezeptorproteine für Limabohnenlektine	84
4.6.1.	^{125}Jod-Markierung der Membranproteine mit der Lactoperoxidase-Methode	84
4.6.2.	Nachweis Limabohnenlektin-bindender Membranproteine auf CCRF-CEM Zellen durch Immunpräzipitation	84
4.6.3.	Affinitätschromatographische Reinigung der Rezeptorsubstanz für das Limabohnenlektin	90
4.6.4.	Proteolytischer Abbau jodierter Membranproteine aus CCRF-CEM Zellen	94
4.6.5.	Biologische Eigenschaften der Rezeptorsubstanz	95
5.	DISKUSSION	97
6.	ZUSAMMENFASSUNG	111
7.	LITERATURVERZEICHNIS	113

1. EINLEITUNG

Schon 1888 wurden von Stillmark [1] die ersten Beobachtungen zur Erythrozyten-agglutinierenden Aktivität eines Pflanzenextraktes beschrieben: Extrakte aus Ricinus communis verklumpten die roten Blutkörperchen. Die agglutinierende Eigenschaft konnte Stillmark einer Proteinkomponente des Rohextraktes zuordnen, die in der Folge Ricin (Ricin I) genannt wurde. Sie ist nicht mit dem toxisch wirkenden Protein (Ricin II) identisch [2]. 1945 gelang es Boyd [3] nachzuweisen, daß ein Extrakt aus Lima-Bohnen (Phaseolus lunatus) spezifisch menschliche Erythrozyten der Blutgruppe A agglutiniert. Er konnte damit die 1936 von Landsteiner gemachten Beobachtungen der Blutgruppenspezifität der Verklumpung von Erythrozyten verschiedener Spezies bestätigen.

In den folgenden Jahren wurden weitere Blutgruppenspezifitäten für verschiedene Pflanzenextrakte nachgewiesen. Die Samen von Lotus tetragonolobus [4,5] und Bandeiraea simplicifolia [6] z.B. enthalten Agglutinine, die spezifisch Erythrozyten der Blutgruppen 0 bzw. B agglutinieren.

1953 gelang es Morgan und Watkins [5], die Zuckerspezifität dieser Agglutinationen nachzuweisen. Die Agglutination der Erythrozyten mit Limabohnenextrakt war durch die Zugabe von N-Acetyl-D-Galaktosamin, die Agglutination mit dem Extrakt aus Lotus tetragonolobus durch die Zugabe von Fucose am stärksten inhibierbar. Die Autoren schlossen aus der Spezifität der Agglutinations-Inhibition, daß Zucker die Blutgruppenspezifitäten der Erythrozyten bestimmen; und zwar N-Acetyl-D-Galaktosamin die Spezifität der Blutgruppe A und Fucose die Spezifität der Blutgruppe 0.

Obwohl die Agglutination von Erythrozyten, Lymphozyten, Retinazellen, Fibroblasten, Spermatozyten, Viren und Bakterien zu den häufig durchgeführten Tests der biologischen Wirkung

von Lektinen zählt, ist die Agglutinationsreaktion der Zellen bisher weitgehend unverstanden. Allgemein anerkannt ist die Tatsache, daß die Vernetzung der Zellen in der Mehrzahl der untersuchten Fälle eine durch die Multivalenz der Lektine bedingte Quervernetzung von Membranrezeptoren auf den Zellen selbst voraussetzt [7,8], und daß diese sogenannten Clusterregionen die Kontaktstellen der Zellen zueinander bilden. Eine Inhibition der Clusterbildung durch Fixierung der Zellen oder Durchführung der Reaktion bei niedrigen Temperaturen unterdrückt die Fähigkeit der Zellen zur Agglutination [9]. Eine Erhöhung der Membranfluidität nach Transformation normaler Zellen oder durch leichte Proteolyse der Membranproteine kann hingegen zu einer 100-fachen Erhöhung der Agglutination führen [10]. Eine generelle Erhöhung der Anzahl von Zellrezeptoren ist nach der Transformation oder Proteasebehandlung der Zellen jedoch nicht zu beobachten.

1954 schlug Boyd die heute noch gebräuchliche Bezeichnung Lektin (Lat.: legere - auswählen) für alle zuckerspezifisch zellagglutinierenden Proteide vor [11]. Mehr als sechzig weitere Lektine sind in der Folgezeit - zumeist aus Leguminosen -, aber auch aus der Schnecke Helix pomatia, aus Pilzen, Bakterien und Viren [12] isoliert und gereinigt worden. Ihre chemische Struktur und Zuckerspezifitäten konnten zum Teil aufgeklärt werden [13-17].

Diese Zuckerspezifitäten wurden häufig benutzt, Lektine aus Rohextrakten spezifisch zu reinigen. 1967 gelang es Agrawal und Goldstein [18], ConA an Sephadex, einem vernetzten Dextrangerüst, zu binden und spezifisch zu eluieren. Immobilisierte Blutgruppen A Substanz wurde benutzt, um die Lektine von Helix pomatia [19] und Dolichos biflorus [20] zu isolieren.

Auch für das Agglutinin aus Limabohnen wurde 1970 von den zwei Arbeitsgruppen Gould und Scheinberg [21,22] und Galbraith und Goldstein [23] eine Methode zur vollständigen

Reinigung des Limabohnenlektins beschrieben. Seit 1945 waren für die Untersuchungen mit Limabohnenlektinen mehr oder weniger stark angereicherte Präparationen aus Phaseolus lunatus verwendet worden [24,25]. Gould und Scheinberg isolierten durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltration über Biogel A 0,5 drei Proteinfraktionen, von denen zwei - Komponente II und Komponente III - agglutinierende Aktivität besaßen. Für beide Komponenten wurden ähnliche Aminosäuren- und Zuckerzusammensetzung nachgewiesen. Das Molekulargewicht für die Komponente II wurde mit 269 000, für die Komponente III mit 138 000 nach analytischer Ultrazentrifugation angegeben.

Die Daten der Gelelektrophorese zusammen mit den Ergebnissen der analytischen Ultrazentrifugation und Aminosäurenanalyse waren die Grundlagen für das folgende Modell der Limabohnenlektine: zwei Untereinheiten mit dem Molekulargewicht 31 000 sind durch eine kovalente Disulfidbrückenbindung miteinander zu einer Proteinuntereinheit mit dem Molekulargewicht 62 000 verbunden. Zwei oder vier dieser Untereinheiten bilden die Komponenten III bzw. II. Nach Galbraith [26] repräsentieren die Komponenten II und III identische Moleküle mit unterschiedlichem Grad der Aggregation.

Die von Galbraith 1971 beschriebene Reinigung der Limabohnen-Isolektine umfaßt neben der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung als spezifischen Reinigungsschritt die Bindung der Lektinfraktion an eine Blutgruppen-A-Substanz-Säule und die nachfolgende spezifische Eluation mit einer 0,4 M GalNac Lösung. Eine an die Affinitätschromatographie anschließende Trennung der Lektine über eine Sephadex G 200 Säule bestätigt die Befunde von Gould und Scheinberg: die an der Sephadex G 200 Säule eluierte Komponente I war im Agglutinationstest mit Erythrozyten inaktiv, die Komponenten II und III agglutinierten Erythrozyten der Blutgruppe A und entsprachen in der Aminosäurenanalyse, in der SDS-Gelelektrophorese und in der Molekulargewichtsbestimmung nach analytischer Ultra-

zentrifugation (Komponente III hat nach Galbraith ein Molekulargewicht von 124 400, die Komponente II ein Molekulargewicht von 247 100) den von Gould und Scheinberg publizierten Daten.

Die Limabohnenlektine wirken wie eine ganze Reihe anderer Phytohämagglutinine mitogen auf Lymphozyten in vitro [27]. Dieses Phänomen der Transformation weißer Blutkörperchen durch PHA wurde erstmals 1959 von Hungerford [28] und Nowell [29] beobachtet und ist seither auch für andere Lektine beschrieben.

Mitogene stimulieren Lymphozyten zu einer polyklonalen Proliferation; sie können eine Reifung vorher ruhender Lymphozyten in vitro induzieren [30]. Verschiedene Mitogene unterscheiden dabei zwischen verschiedenen Zelltypen (B und T Zellen, Zellen verschiedener Tierspezies), und es kann letztlich nicht ausgeschlossen werden, daß Mitogene auch unterschiedliche Differenzierungsstadien von B oder T Zellen erkennen [31]. Während antigene Substanzen wegen der strikten Spezifität der Antigenbindung durch Zellrezeptoren nur von einem Bruchteil der in einer Population vorhandenen Lymphozyten erkannt werden, binden mitogene Substanzen an eine Vielzahl von Lymphozyten unterschiedlicher Spezifität und stimulieren sie zu einer polyklonalen Proliferation. Die Wirkung der Mitogene auf Lymphozyten läßt sich zuerst anhand der Membranveränderungen [32,33], erhöhtem Transport von Ca^{2+} in die Zellen [34] und später erhöhtem Einbau von ^{3}H-Uridin, ^{3}H-Leucin und ^{3}H-Thymidin messen [35,36]; 48 bis 72 Stunden nach Mitogenzugabe können in den stimulierten Zellkulturen zahlreiche Blastzellen gezählt werden. Die weitgehende biologische Differenzierung nach Stimulation mit Lektinen ist für T-Zellpopulationen anhand der Induktion von Killer-Zellen [37] und der Induktion von Supressor- oder Helfer-Funktionen bewiesen worden [38]. Unlösliches PHA [39] oder ConA [40,41], Lipoprotein der äußeren Zellwand von E.coli [42-44], sowie LPS und PPD stimulieren als B-Zellmitogene die Zellen nicht nur zur DNS-, RNS-, Proteinsynthese und Zellteilung, sondern letztlich zur Differenzierung in

Plasmazellen, die in der Lage sind, große Mengen Immunglobulin zu synthetisieren [45].

Solche Mitogen-stimulierten Lymphozytenpopulationen sind eine wichtige Voraussetzung für biochemische Untersuchungen proliferierender und sich differenzierender Zellen, zum Beispiel im Hinblick auf die antigene Immunantwort in vivo. Der eigentliche Mechanismus der Lektinstimulation ist ebenso wie der Mechanismus der antigenen Stimulation von Zellen noch weitgehend ungeklärt. Es ist jedoch sicher, daß Mitogene für eine längere Zeit (8 bis 20 Stunden) an die Zellen gebunden sein müssen, um eine Differenzierung zu induzieren [32,46]. Der Erfolg der Stimulation ist dabei unter anderem von der Valenz-bedingten Bindungsstärke des Lektins an die Membranrezeptoren abhängig [47-50].

Neben den mitogenen Eigenschaften (Imitation eines polyklonalen antigenen Reizes) wurden für einige Lektine andere, die in vivo-Situation imitierenden Effekte gefunden: Concanavalin A und WGA wirken wie Insulin verstärkend auf den Glukose-Transport und inhibieren die Epinephrin-stimulierte Lipolyse in isolierten Adipozyten; die Lektine inhibieren die Adenylatcyclase-Aktivität isolierter Fettzellen-Membranen und konkurrieren mit Insulin um dessen Rezeptoren auf den natürlichen Zielzellen des Insulins [51,52]. Diese Untersuchungen zur direkten Bindung der beiden Lektine an die Zielzellen des Insulins ermöglichten eine Isolation des Insulin-Rezeptors an ConA-Sepharose. Die Bindung von PHA an Thrombozyten führt zu einer der normalen (Thrombin- oder ATP-induzierten) Platelets-release-Reaktion sehr ähnlichen Folgereaktion [53]. Auch hier konnte das bindende Protein von Thrombozytenmembranen isoliert werden [54].

Wegen ihrer spezifischen Bindung an Zellstrukturen fassen Gold und Balding [12] die Lektine pflanzlicher und tierischer Herkunft unter dem Begriff "Rezeptor-spezifische Proteine" (RSP) zusammen. Diese RSPs, die sich von den eben-

falls Rezeptor-spezifischen Antikörpermolekülen in vielfältiger Weise unterscheiden, wurden in den letzten Jahren zu wichtigen Hilfsmitteln bei den Untersuchungen verschiedenster Membranstrukturen und Membranfunktionen eukaryontischer Zellen. Von allen bisher rein dargestellten Lektinen ist das Mitogen aus Canavalia ensiformis im Hinblick auf seine Interaktion mit Zellmembranen das am besten untersuchte [55].

Mit Hilfe von immobilisierten Lektinen - ConA, LcA, WGA, RCA, PWM und anderen - wurden Rezeptorproteine von verschiedenen Lymphozytenpopulationen isoliert und biochemisch charakterisiert [56-60]. Zu den ConA und LcA bindenden Proteinen von B und T Zellen zählen neben Immunglobulinen [61] die H-2K, H-2D und Ia Antigene [62,63] von Mäuse- und menschlichen Lymphozyten, sowie das Thy-1 Antigen von Ratten-Thymozyten [64]. Ebenfalls gut untersucht sind Lektin-bindende Rezeptorproteine von Erythrozyten [65-67].

An Lektine bindende Glykoproteine wurden auch von Platelets [68], Synaptischen Plasmamembranen [69] und Viren [70] isoliert und zum Teil charakterisiert.

2. PROBLEMSTELLUNG

Wie in der Einleitung zur Arbeit schon erwähnt, sind in der Literatur zwei Limabohnen-Isolektine als Komponente II und III beschrieben, die aus identischen Untereinheiten mit dem Molekulargewicht 31 000 aufgebaut sind. Die Komponenten II und III stellen nach Galbraith [26] unterschiedlich große Aggregate dieser Untereinheiten mit dem Molekulargewicht 247 000 und 124 000 dar. Versuche im Labor von I.J. Goldstein erbrachten Hinweise darauf, daß aus Limabohnen (Phaseolus lunatus) möglicherweise größere Aggregate nativer Limabohnenisolektine isoliert werden können.

In dieser Arbeit sollte nun versucht werden, diese natürlich vorkommenden höheren Aggregate aus Limabohnen zu isolieren und ihre chemischen und biologischen Eigenschaften mit den bereits beschriebenen Komponenten II und III zu vergleichen. Die Limabohnenlektine sollten weiterhin unter Ausnutzung der Zuckerspezifität des Lektins für Galaktosamin mit einer zu synthetisierenden GalN-Sepharose affinitätschromatographisch gereinigt werden.

Die Grundlage der biologischen Wirksamkeit der Limabohnenlektine ist die Erkennung spezifischer Zuckerstrukturen auf den Zielzellen durch das Lektin. Für die Erythrozyten-agglutinierenden Eigenschaften der Limabohnenlektine ist schon von Boyd [3] die Blutgruppen-A-Substanz menschlicher roter Blutkörperchen verantwortlich gemacht worden; die endständige Galaktosamin-Struktur der Blutgruppen-A-Substanz wird von Limabohnenlektin erkannt. Für die Stimulation der Lymphozyten durch mitogene Lektine ist eine Bindung des Mitogens an die Zellen erforderlich [32]. Diese Bindung wird durch die Fähigkeit der Lektine, bestimmte Zuckerstrukturen auf Zellen zu erkennen und spezifisch zu binden, ermöglicht. Die Limabohnenlektin-spezifischen Zuckerstrukturen sind Galaktosamin und Derivate des Aminozuckers.

Anhand dieser Zuckererkennung durch das Lektin sollten in der vorliegenden Arbeit die Limabohnenlektin-bindenden Strukturen (Glykoproteine, Glykolipide) auf Lymphozyten mit Hilfe der spezifischen Immunpräzipitation nachgewiesen und affinitätschromatographisch mit einer zu synthetisierenden Lima-Sepharose isoliert werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Puffer, Medien und Medienzusätze

200 mM Lektinpuffer

150 mM NaCl
36 mM Na_2HPO_4
14 mM NaH_2PO_4
0,1 mM $CaCl_2$
0,1 mM $MnCl_2$
0,1 mM $MgCl_2$
0,002 % NaN_3
pH 7,0

50 mM Lektinpuffer

37,5 mM NaCl
9,0 mM Na_2HPO_4
3,5 mM NaH_2PO_4
0,1 mM $CaCl_2$
0,1 mM $MnCl_2$
0,1 mM $MgCl_2$
0,002 % NaN_3
pH 7,0

PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)

9,0 g NaCl
1,15 g Na_2HPO_4
0,20 g KH_2PO_4 / Liter bidest. Wasser
pH 7,2

PBS modifiziert

Für alle Arbeiten mit Limabohnenlektin (HA-Tests, Säulentrennungen) wurden dem Phosphatpuffer folgende Salze zugefügt:

0,1 mM $CaCl_2$
0,1 mM $MnCl_2$
0,1 mM $MgCl_2$

PBS-Solubilisierungspuffer

PBS modifiziert, 0,5 % NP 40 0,1 mM PMSF

PMSF wurde in iso-Propanol vorgelöst und dann in entsprechender Menge zum Puffer pipettiert.

TKM-Puffer

50 mM Tris·HCl
25 mM KCl
5 mM $MgCl_2$
5 mM $CaCl_2$
pH 7,2

TKM-Puffer modifiziert

Für alle Arbeiten mit Limabohnenlektin oder Lima-Sepharose (Säulenelution, Dialysen) wurden dem TKM-Puffer nach der pH-Einstellung folgende Salze zugefügt:

0,1 mM $CaCl_2$
0,1 mM $MgCl_2$
0,1 mM $MnCl_2$

Hanks' Puffer (Hanks' balanced salt solution, GIBCO)

MEM (Minimalmedium, FLOW)

RPMI 1640 (Zellkultivierungsmedium, GIBCO)

RPMI 1640 βPSG (RPMI 1640 modifiziert)

5×10^{-5} M β-mercapto-Äthanol (Merck)
100 µ/ml Penicillin (GIBCO)
100 µ/ml Streptomycin (GIBCO)
2 mM Glutamin (FLOW)

Autologes Rattenserum
(Zentralinstitut für Versuchstierzüchtung, Hannover)
30 Minuten bei 56° C inaktiviert

Humanserum (FLOW oder GIBCO)
30 Minuten bei 56° C inaktiviert

FKS (Fötales Kälberserum, FLOW)
30 Minuten bei 56° C inaktiviert

3.1.2. Lektine

Concanavalin A wurde aus Concanavalia ensiformis (Botanischer Garten Tübingen) im Labor von Dr. W. Bessler nach Goldstein [18] isoliert.

Limabohnenlektin wurde aus Phaseolus lunatus (5111 Carolina oder Sieva Pole Limabohnen, W. Atlee Burpee Co., Clinton Iowa USA) isoliert.

PHA wurde von Difco bezogen (Bacto Phytohämagglutinin P Difco 3110-57).

3.1.3. Versuchstiere

Ratten für die Isolierung von Lymphozyten: Stamm Lewis (Zentralinstitut für Versuchstierzüchtung, Hannover).

Kaninchen zur Antikörperproduktion: Stamm weiße Russen (Versuchstieranstalt Gassner Sulzfeld).

3.1.4. Chemikalien, Säulenmaterial

Amersham:	^{14}C-Galaktosamin (> 45 mCi/mmol)
	^{3}H-Leucin (22 Ci/mmol)
	^{3}H-Thymidin (24 Ci/mmol)
	^{3}H-Uridin (27 Ci/mmol)
	^{125}J (11-17 mCi/µg Jod)
Beckmann:	Eichstandard zur Aminosäurenanalyse
Behring:	Anti-Kaninchen JgG von der Ziege
	Freund's komplettes Adjuvans
Diaflo:	Membranen zur Ultrafiltration PM 10, YM 10
Flow:	Mikrotiterplatten zur Zellkultivierung mit flachem Boden (H 8292 - 213020)
Fresenius:	Lymphodex LSM 1.077 (Ficoll)
Ilford:	Microphen Entwickler für Fotoplatten
Kodak:	Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme (X Omat R x R 5)
	Fotoplatten (metallographic plates)
	Röntgenfilme X Omat R x R 5 (18 x 24)
L'Industrie Biologique Francaise S.A.:	Indubiose
Miles:	Lactoperoxidase
Packard:	Soluene 350 Gewebelöser
Pfanstiel:	N-Acetyl-D-Galaktosamin

Pharmacia:	Säulenmaterialien: ConA Sepharose 4 B; Sepharose 4 B; CH-Sepharose 4 B; Epoxy-aktivierte Sepharose 6 B; Sephadex G 200 superfine.
Roth:	α-Methyl-Mannosid Szintillationsflüssigkeit Rotoszint 11
Serva:	Acrylamid Ammoniumpersulfat Ampholytlösung (Servalyt pH 2-11) Bisacrylamid Bromphenolblau Chymotrypsinogen Coomassie Brilliant Blau G 250 Galaktosamin Harnstoff (zur Gelelektrophorese) Siliconlösung PBS PMSF Pronase Visking Dialyseschläuche
Shell:	NP 40 (Nonidet P 40)
Sigma:	Rinderserumalbumin
Whatman:	Glasfiber Filterstreifen 934 AH (1 1/2 x 12)

Außer den hier aufgeführten wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck AG, Darmstadt, verwendet.

3.1.5 Säulen, Synthesen, Charakteristika

3.1.5.1. Kopplung von Galaktosamin an CH-Sepharose 4 B

Die Kopplung von Galaktosamin wurde nach Allen und Neuberger [71] modifiziert durchgeführt.

15 g Sepharose wurden in 120 ml 0,5 M NaCl Lösung gequollen, über der Fritte mit 0,5 M NaCl und mit Wasser pH 4,5 gewaschen. 1 g Galaktosamin und 1 µCi ^{14}C-Galaktosamin wurden in 75 ml Wasser pH 5,0 gelöst. In die Lösung wurde die gewaschene Sepharose und Carbodiimid (1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid)zu einer Endkonzentration von 0,1 M Carbodiimid zugefügt.
Der pH wurde kontrolliert: pH 5,3.
Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend über Nacht mäßig geschüttelt. Nach Abbruch der Reaktion wurde das Gelmaterial nach der Vorschrift der Firma Pharmacia gewaschen [72] und mit 50 mM Lektinpuffer äquilibriert.

Im Waschüberstand des Gels wurde zur Kontrolle der Bindungsreaktion die Radioaktivität gemessen.

Säulenvolumen	55	ml
Säulendurchmesser	2	cm
Säulenhöhe	17,5	cm
Säulenbezeichnung	GalN-Sepharose 4 B	

3.1.5.2. Kopplung von Limabohnenlektin an CNBr-aktivierte Sepharose 4 B

Zur Kopplung an die aktivierte Sepharose 4 B wurde Limabohnenlektin aus verschiedenen Aufarbeitungen vereinigt, gegen 0,1 M Boratpuffer 0,5 M NaCl pH 7,2 dialysiert und in der Amiconzel-

le auf 25 ml Volumen eingeengt. Der Lektinlösung wurden 500 mg N-Acetyl-D-Galaktosamin zum Schutz der Zuckerbindungsstelle des Lektins zugefügt. 25 ml Sepharose 4 B wurden mit Wasser gewaschen und in 25 ml eiskaltem bidestilliertem Wasser aufgenommen. Unter starkem Rühren wurden dem eisgekühlten Gel 12 mg CNBr/ml Sepharose zugemischt. Die Reaktion wurde bei pH 11 gestartet und der pH mit eisgekühlter NaOH 7 Minuten lang nachtitriert. Die Temperatur im Reaktionsgemisch überschritt nicht 16° C. Die Aktivierungsreaktion wurde nach 7 Minuten durch Zugabe von Eis abgebrochen und das Gel nach der Vorschrift der Firma Pharmacia [72] über der Fritte gewaschen.

Die Kopplungsreaktionen des Limabohnenlektins an das aktivierte Gel wurde bei 4° C durchgeführt. Die Reaktionsdauer betrug 48 Stunden. Das Gel wurde nach der Kopplung von etwa 90 % des Lektins (Kontrolle durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm im Reaktionsüberstand) über der Fritte mit Wasser und 200 mM Lektinpuffer gewaschen.

Säulenvolumen	**12,5 ml**
Säulendurchmesser	**1,2 cm**
Säulenhöhe	**11,0 cm**
Säulenbezeichnung	**Lima-Sepharose 4 B**

3.1.5.3. Kopplung von Limabohnenlektin an Epoxy-aktivierte Sepharose 6 B

Limabohnenlektin, das zuckerspezifisch an GalN-Sepharose gereinigt worden war, wurde zur Entfernung der Galaktose gegen 200 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF und dann zur Säulenkopplung gegen 0,1 M Boratpuffer pH 9,5 dialysiert. Die Dialyse wurde bei 4° C durchgeführt.

1,5 g Epoxy-aktivierte Sepharose 6 B wurden in bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Kopplungsreaktion wurde bei 36° C unter Schütteln durchgeführt (Kontrolle der Kopplung von Protein durch Messung der optischen Dichte im Reaktionsüberstand). Die Reaktion wurde nach 30 Stunden abgebrochen und das Gel mit bidestilliertem Wasser 0,1 mM $CaCl_2$ 0,1 mM $MgCl_2$ 0,1 mM $MnCl_2$ über der Fritte gewaschen. Das Gel wurde vor der ersten Verwendung mit 50 mM TKM Puffer 3 M $MgCl_2$ gewaschen und mit dem Solubilisierungspuffer äquilibriert.

In Vorversuchen war der inaktivierende Effekt des pH während der Kopplung anhand der hämagglutinierenden Eigenschaften des Lektins untersucht worden. Nach 90-stündiger Dialyse des Proteins gegen 0,1 M Boratpuffer pH 9,5 bei 4° C war die spezifische Agglutination der Erythrozyten durch das Lektin nur schwach verringert. Durch 90-stündige Dialyse gegen den gleichen Puffer bei 37° C wurde die spezifische Aktivität zu mehr als 50 % reduziert.

Säulenvolumen	4,5 ml
Säulendurchmesser	1,5 cm
Säulenhöhe	2,5 cm
Säulenbezeichnung	Lima-Sepharose 6 B

3.1.5.4. ConA-Sepharose (Pharmacia)

Säulenvolumen	92 ml
Säulendurchmesser	3,0 cm
Säulenhöhe	13,0 cm
Säulenbezeichnung	ConA-Sepharose 4 B

3.1.5.5. Sephadex G 200 superfine Säule (Pharmacia)

Säulenvolumen	2 200	ml
Säulendurchmesser	4,0	cm
Säulenhöhe	175,0	cm
Auftragsvolumen	3 - 5	ml
Pumpgeschwindigkeit	0,5	ml/Stunde/cm²
Fraktionen	150	Tropfen ≙ ~ 11 ml

3.2. Methoden

3.2.1. Isolation der Limabohnenlektine

3.2.1.1. Mechanischer Aufschluß der Limabohnen (Phaseolus lunatus)

60 g Limabohnen wurden im Waring Mixer mit 480 ml 200 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF im Abstand von 20 Minuten zweimal vier Minuten aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde anschließend 60 Minuten bei 4° C auf dem Magnetrührer gerührt, durch ein Mulltuch filtriert, und das Filtrat 60 Minuten zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge, 4° C, 8 000 g). Das Sediment wurde verworfen.

3.2.1.2. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Zum Überstand der Zentrifugation wurden 197 g Ammoniumsulfat/Liter Lektinlösung zugerührt, mit 6 N HCl auf pH 4,4 eingestellt und mindestens zwei Stunden im Eis stehen gelassen. Das während dieser Zeit ausgefallene Protein wurde 60 Minuten in der Sorvall (4° C, 8 000 g) abzentrifugiert. Dem Überstand der Zentrifugation wurden 90 g Ammoniumsulfat/Liter Proteinlösung zugerüht und mit 50 %iger NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

Die über Nacht im Eisbad präzipitierte Lektinfraktion wurde für 60 Minuten zentrifugiert (Sorvall, 4° C, 8 000 g). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 20 ml 50 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF gelöst.

3.2.1.3. Affinitätschromatographische Reinigung der Limabohnenlektine an ConA-Sepharose 4 B

Das in 50 mM Lektinpuffer gelöste Protein aus 3.2.1.2. wurde auf die ConA-Sepharose Säule (3.1.5.4.) aufgetragen und mit 50 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF bis zu einer $OD_{280\ nm}$ 0,05 eluiert. Die an ConA-Sepharose bindende Lektinfraktion wurde dann mit 0,1 M α-Methyl-Mannosid in 200 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF eluiert. Die Fraktionen des spezifisch gebundenen Eluats wurden vereinigt und in der Amiconzelle auf 3 bis 5 ml Volumen zum Auftrag auf die Sephadex G 200 superfine Säule eingeengt. Die ConA-Sepharose nicht bindenden Fraktionen wurden verworfen.

3.2.1.4. Affinitätschromatographische Reinigung der Limabohnenlektine an GalN-Sepharose 4 B

Das in 50 mM Lektinpuffer gelöste Protein aus 3.2.1.2. wurde auf die GalN-Sepharose Säule (3.1.5.1.) aufgetragen und mit 50 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF bis zu einer $OD_{280\ nm}$ 0,05 eluiert. Die an GalN-Sepharose bindende Lektinfraktion wurde dann mit 1 M Galaktose in 200 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF spezifisch eluiert. Die Fraktionen des mit Galaktose eluierten Proteins wurden vereinigt und in der Amiconzelle zum Auftrag auf die Sephadex G 200 superfine Säule auf 3 bis 5 ml Volumen eingeengt. Die GalN-Sepharose nicht bindenden Proteinfraktionen wurden verworfen. Das Säulenmaterial wurde in unregelmäßigen Abständen mit 50 mM PBS 3 M $MgCl_2$ zur Entfernung des nicht mit 1 M Galaktose eluierbaren Lektins gespült.

3.2.1.5. Trennung der Limabohnenlektine an einer Sephadex G 200 superfine Säule

Die eingeengten Lektinfraktionen aus 3.2.1.3. bzw. 3.2.1.4. wurden vorsichtig auf die Sephadex G 200 superfine Säule (3.1.5.5.) aufgetragen und mit 200 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF eluiert.

3.2.2. Reinheitskontrollen der Limabohnenlektine

3.2.2.1. SDS Gelelektrophorese nach Laemmli [73]

Die Gradientengele (10 % - 15 % bzw. 8 % - 18 % Acrylamid) wurden mit verringerter TMED Konzentration gegossen (15 µl TMED/100 ml Gellösung).

3.2.2.2. Isoelektrische Fokussierung nach Vesterberg [74]

Die Lektinproben wurden gegen 8 molaren Harnstoff dialysiert. Die Isoelektrische Fokussierung wurde in Glasröhrchen durchgeführt.

Die Gele wurden wie folgt gegossen:
0,4 ml Acrylamidlösung (20 % Acrylamid, 1 % Methylenbisacrylamid), 0,15 ml Ampholytlösung, 0,01 ml TMED und 0,02 ml 10 %ige $(NH_4)_2S_2O_5$ Lösung wurden auf dem Vortex Mixer mit 0,885 ml der Lektinlösung in 8 M Harnstoff schnell vermischt und sofort in die Glasröhrchen gefüllt.
Gelvolumen: 1,47 ml
Geldurchmesser: 2 mm

Die Fokussierung wurde in der Regel am folgenden Tag durchgeführt. Die Bedingungen:

Anode: 0,01 M H_3PO_4
Kathode: 0,02 M NaOH
Spannung: 300 V konstant für 19 Stunden
400 V konstant für weitere 2 Stunden

Die Proteine wurden nach Beendigung der Fokussierung in 12,5 %iger TCA gefällt, die Gele noch zweimal mit je 20 ml TCA gewaschen und, wie in 3.2.8. beschrieben, gefärbt. Zur Kontrolle des pH-Gradienten im Gel wurden drei Gelröhrchen, wie oben beschrieben, aber ohne Zusatz von Protein gegossen. Die Kontrollgele wurden nach Beendigung der Fokussierung sofort in 0,5 cm lange Stücke geschnitten und in je 1 ml bidestilliertem Wasser aufgenommen. Der pH wurde nach 1 bis 2 Stunden gemessen.

3.2.2.3. Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation wurde in einer Beckmann-Zentrifuge, Spinco Modell E mit Schlierenoptik, durchgeführt.

Rotor:	ANF
Temperatur:	20° C
Geschwindigkeit:	44 770 Upm
Fotografische Aufnahmen während der Sedimentation:	Angaben in den Legenden der jeweiligen Abbildung
Entwicklung der Fotoplatten:	5 Minuten in einer Microphenlösung nach Vorschrift der Firma Ilford
Auswertung der Fotoplatten:	Nach einem Programm für den Tischrechner HP 25 (Hewlett Packard, Modell 25) wie angegeben.

Programm für HP 25 zur Auswertung der fotographischen Aufnahmen aus der analytischen Ultrazentrifugation*):

↑ 5 · 7 + fln ↑ g x² STO + 2 ↓ <=>

Σ + GTO 00 RCL 5 RCL 7 RCL 4 x RCL 3 ÷ -

RCl 6 RCl 7 g x² RCL 3 ÷ - ÷ STO 1 (= $\frac{dlnr}{dt}$)

RCL 0 <— K x GTO 00

3.2.2.4. Aminosäurenanalyse der Limabohnenlektine nach der Molekulargewichtstrennung

Hydrolyse der Lektine mit 6 N HCl: 500 bis 600 mg der Lektine Lima poly I, Lima poly II, Lima 247 und Lima 124 wurden gegen 50 mM Lektinpuffer dialysiert und lyophilisiert. Die Proteine wurden in je 2 ml 6 N HCl aufgenommen und nach Überschichtung mit Stickstoff hydrolysiert. Nach 18-stündiger Hydrolyse bei 110° C wurde die Salzsäure am Rotationsverdampfer abgezogen, die Probe mit destilliertem Wasser nachgewaschen und zur Trockne eingeengt. Jedes Hydrolysat wurde kurz vor dem Auftrag auf die Säulen zur Aminosäurenanalyse in 4 ml Auftragspuffer gelöst. Auf die Säulen wurde je 1 ml Volumen aufgetragen.

Perameisensäure-Oxidation der Lektine [75]*:* Je 500 mg Lima poly I, Lima poly II, Lima 247 und Lima 124, die affinitätschromatographisch an ConA-Sepharose gereinigt worden waren, wurden nach der Trennung an der Sephadex G 200 superfine Säule gegen bidestilliertes Wasser dialysiert und lyophilisiert. Das Protein wurde in 1 ml Methanol und 5 ml 99 %iger Ameisensäure gelöst und für 30 Minuten bei -5° C stehen gelassen. Nach Zugabe von 10 ml frisch hergestellter Perameisensäure

---

*) Für die Ausarbeitung des Programms und für die Hilfe bei den Arbeiten mit der Analytischen Ultrazentrifuge danke ich besonders Herrn Dr. E. Oldmixon. Frau Dozentin Dr. Eva-Maria Sander danke ich für die freundliche Überlassung der Analytischen Ultrazentrifuge.

wurde weitere 150 Minuten inkubiert.
Die Perameisensäure wurde wie folgt hergestellt:

5 % H_2O_2
95 % Ameisensäure (99 %ig)
1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen

Die oxidierten Proben wurden nach Zugabe von je 100 ml eisgekühltem Wasser eingefroren, später gegen PBS dialysiert (4° C) und lyophilisiert. Die getrockneten Proben wurden in je 2 ml 6 N HCl aufgenommen, wie oben beschrieben hydrolysiert und für die Aminosäurenanalyse vorbereitet.

Eichung: Als Eichstandards für den Aminosäurenanalysator wurden Standard-Aminosäurengemische der Firma Beckmann benutzt.

Auswertung der Extinktionskurven der Aminosäurenanalyse:
Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Programms für den Tischrechner Hewlett Packard 25.
Programm*):

RCL 1 Enter RCLO - STO 5 2 ·/. Enter RCLO + R/S

CL x RCL 2 Enter RCL 3 + Enter RCL 4 + Enter

RCL 5 x f Prgm
Basislinie STO 0
Gesamthöhe STO 1
Schwarze Punkte STO 2
Rote Punkte STO 3
Bruchteile STO 4
-
R/S

---

*) Für die Ausarbeitung des Programms danke ich Herrn Dr. E. Oldmixon. Für die Anfertigung der Aminosäurenanalysen gilt mein besonderer Dank Herrn H. Rotering.

3.2.2.5. Diffusionstest nach Ouchterlony [76]

Die Diffusionstests wurden in 1,5 %igen Indubiose Agarplatten (PBS gepuffert) durchgeführt. Die Lektinproben wurden auf genau 1 mg Protein/ml Puffer eingestellt. Es wurden 10 µl der Lektin- bzw. der Antiserumlösung eingesetzt. Die Platten wurden bei 4° C inkubiert und der Verlauf der Präzipitation regelmäßig kontrolliert.

3.2.3. Reinigung einer Antikörperfraktion gegen Lima 247

3.2.3.1. Herstellung gereinigter Antikörper

Zur Immunisierung verwendetes Lektin: Lima 247 (affinitätschromatographisch an GalN-Sepharose 4 B gereinigt) wurde nach der Trennung über die Sephadex G 200 superfine Säule gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert und mit Freund's komplettem Adjuvans 1:2 verdünnt. Der Proteingehalt betrug 0,5 mg Lektin/ml Suspension.

Gewinnung des Antiserums: Dem Kaninchen wurde die Proteinlösung in Freund's komplettem Adjuvans subcutan gespritzt (0,3 - 0,5 ml/Injektion). Zur Isolation der Antikörperfraktion wurden 20 bis 30 ml Blut aus der Ohrvene entnommen und das Blut über Nacht zur Gerinnung bei 4° C stehen gelassen. Der Blutkuchen wurde dann in der Christ Zentrifuge (4° C, 30 Minuten bei 3 000 Upm) abzentrifugiert und noch einmal mit PBS nachgewaschen. Der Überstand wurde mit dem Serumüberstand der ersten Zentrifugation vereinigt.

Affinitätschromatographische Reinigung der Antikörperfraktion: Das Serum wurde über eine Affinitätssäule (Lima-Sepharose 4 B) gereinigt. Das Säulenmaterial wurde vor dem Auftrag des Serums mit 3 M $MgCl_2$ in TKM Puffer pH 7,2 gereinigt und anschlie-

ßend mit PBS äquilibriert. 20 bis 30 ml des Serums wurden auf die Säule aufgetragen und bis zu einer $OD_{280\ nm}$ 0,05 mit PBS eluiert. Die gebundene Antikörperfraktion wurde mit 3 M $MgCl_2$ in 50 mM TKM Puffer eluiert, sofort gegen TKM Puffer und anschließend gegen PBS dialysiert und in der Amiconzelle (Filter PM 10) eingeengt. Präzipitiertes Protein wurde bei 8 000 g (4° C, 15 Minuten) abzentrifugiert. Die gereinigte Antikörperfraktion wurde in kleinen Fraktionen bei -20° C aufbewahrt und vor Verwendung in der Immunpräzipitation nicht häufiger als einmal aufgetaut.

3.2.3.2. Reinheitskontrolle der Antikörperfraktion

Ouchterlony-Diffusionstest: Die Diffusionstests wurden in 1,5 % Indubiose-Agarose-Platten (PBS gepuffert) durchgeführt. Die Proteinkonzentration der eingesetzten Lektine betrug 1 mg Protein/ml Lösung.
Die Präzipitation wurde bei 4° C durchgeführt und der Verlauf in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

SDS-Gelelektrophorese: Das ungereinigte Serum, sowie die an die Affinitätssäule bindenden und nicht bindenden Serumfraktionen wurden gegen bidestilliertes Wasser dialysiert, lyophilisiert und in SDS-Probenpuffer zur Gelelektrophorese [73] aufgenommen. Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel 2 Minuten gekocht.

3.2.4. Hämagglutinationstest mit Limabohnenlektinen

3.2.4.1. Hämagglutination [77]

Erythrozyten: Es wurden Humanerythrozyten der Blutgruppe A 1 in den Hämagglutinationstest eingesetzt. Blut aus ausdatierten Blutkonserven wurde in der Christ-Zentrifuge 4 mal mit PBS gewaschen (4° C, 400 g) und mit PBS oder Lektinpuffer auf einen Erythrozytengehalt von 2 oder 3 % eingestellt.

Lektine: Im Test wurden gereinigte Lektine oder ungereinigte Lektinfraktionen eingesetzt. Die Proteinkonzentration wurde mit 200 mM Lektinpuffer in der Regel auf 1 mg Protein/ml Lösung eingestellt.

Test: In V-förmigen Mikrotiterplatten wurden je Vertiefung 50 µl Lektinpuffer vorgelegt. Die zu testenden Lektine wurden in einer 1:2 Verdünnungsreihe in der Regel bis 1:2 448 verdünnt. Nach Zugabe von 50 µl der 2 %igen Erythrozytenlösung wurden die Mikrotiterplatten eine oder zwei Stunden bei 37° C inkubiert und anschließend ausgewertet.

Auswertung: Die Titer entsprechen dem reziproken Wert der Verdünnung des Lektins, bei der die Erythrozyten gerade noch agglutinieren. Die angegebene spezifische agglutinierende Aktivität errechnet sich wie folgt:

$$\text{Spezifische aggl. Aktivität} = \frac{\text{Titer}}{\text{mg Protein/ml Lösung}}$$

3.2.4.2. Inhibition der Hämagglutination

Inhibition mit GalNac: Zu den N-Acetyl-D-Galaktosamin Verdünnungsstufen in Lektinpuffer (50 µl GalNac-Lösung/Vertiefung der Platte) wurden je Verdünnung 50 µl Lektinlösung mit be-

stimmtem Titer zupipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend für 30 Minuten bei 37° C, und nach Zugabe von 50 µl einer 3 %igen Erythrozytenlösung weitere 60 Minuten inkubiert.

3.2.5. Stimulationsexperimente von Lymphozyten mit Limabohnenlektinen

3.2.5.1. Stimulation von Rattenlymphozyten

Präparation der Lymphozyten aus Milz und MLN: Den kurz vor der Organentnahme getöteten Tieren wurden die Milz und die mesenterialen Lymphknoten steril entnommen und im Potter in MEM homogenisiert. Die Zellsuspension wurde durch sterile Watte filtriert und 3 mal mit MEM gewaschen. Die Zellen wurden jeweils 10 Minuten bei 4° C und 400 g zentrifugiert.

Die Erythrozyten in der Zellpräparation wurden nach Roos et al. [78] mit Ammoniumchlorid lysiert:

9 Teile Ammoniumchlorid 0,83 %ig
1 Teil 0,17 M Tris · HCl
pH 7,2
10 Minuten Lyse der Erythrozyten bei Raumtemperatur

Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Lymphozyten noch einmal mit MEM gewaschen und in RPMI 1640 Medium mit Zusatz von Penicillin, Streptomycin, Glutamin, β-Mercaptoäthanol (3.1.1.) und 10 % autologem Rattenserum aufgenommen. Nach der Bestimmung der Lebendzellzahl (3.2.5.4.) wurde die Zellzahl für die Versuche entsprechend eingestellt. Für Stimulationsversuche wurden 100 µl der Zellsuspension zu je 50 µl der Mitogenverdünnung in Mikrotiterplatten pipettiert.

In der Stimulation eingesetzte Mitogene: In den Stimulationsexperimenten mit Rattenlymphozyten wurden die Mitogene Lima poly (I + II), Lima 247, Lima 124 und ConA in der Ausgangskonzentration von 1 mg Protein/ml Medium eingesetzt.

Die Mitogene wurden in den Mikrotiterplatten direkt in einer 1:2 Verdünnungsreihe verdünnt.

Markierung der Zellen mit ^{3}H-Thymidin, ^{3}H-Leucin und ^{3}H-Uridin: Die Lymphozyten wurden in Mikrotiterplatten mit flachem Boden bei 37° C in einem CO_2-Inkubator (5 % CO_2) bei 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

a) Nach 48 Stunden Kultivierung der Zellen mit den Mitogenen wurde je Vertiefung der Mikrotiterplatten 20 µl einer ^{3}H-Thymidinlösung zupipettiert, entsprechend 1 µCi ^{3}H-Thymidin/170 µl Zellkultur. Die Markierungszeit betrug 24 Stunden.
Die ^{3}H-Thymidinlösung wurde nach K. Resch (p.M.) angesetzt.

b) Gleichzeitig mit der Zellsuspension wurden je 50 µl Mitogenverdünnung/Vertiefung der Mikrotiterplatte 20 µl einer ^{3}H-Leucinlösung zupipettiert, entsprechend 1 µCi ^{3}H-Leucin/170 µl Zellkultur. Die Markierungszeit betrug 24 Stunden.
Die ^{3}H-Leucinlösung wurde nach K. Resch (p.M.) angesetzt.

c) Nach 20 Stunden Kultivierung der Zellen mit den Mitogenen wurden je Vertiefung der Mikrotiterplatten 20 µl einer ^{3}H-Uridinlösung zupipettiert, entsprechend 1 µCi ^{3}H-Uridin/170 µl Zellkultur. Die Markierungszeit betrug 4 Stunden.
Die ^{3}H-Uridinlösung wurde nach K. Resch (p.M.) hergestellt.

3.2.5.2. Stimulation von Humanlymphozyten

Präparation von Lymphozyten aus Blut [79]: 50 ml heparinisiertes Blut wurden mit 100 ml Hank's Puffer (20° C) verdünnt. Je 35 - 40 ml der Zellsuspension wurden auf 25 ml Ficoll (20° C) geschichtet und 40 Minuten bei 20° C und 400 g in der Christ-Zentrifuge zentrifugiert. Die die Lymphozyten enthaltende Bande wurde nach der Zentrifugation abpipettiert und die Lymphozyten 3 mal mit MEM gewaschen (Zentrifugationsbedingungen des Waschvorgangs: Christ-Zentrifuge, 15 Minuten, 4° C, 400 g). Die Zellzahl wurde nach dem letzten Waschen mit RPMI 1640 Medium, 10 % Humanserum (modifiziert wie in 3.1.1. beschrieben) auf die im Versuch gewünschte Zellzahl eingestellt.

In der Stimulation eingesetzte Mitogene: In den Stimulationsexperimenten mit Humanlymphozyten wurden die Mitogene Lima poly I, Lima poly II, Lima 247, Lima 124 und ConA in der Ausgangskonzentration von 1 mg Protein/ml Medium eingesetzt. Die Mitogenverdünnungen wurden wie in 3.2.5.1. beschrieben angelegt.

Markierung der Zellen mit ^{3}H-Thymidin, ^{3}H-Leucin und ^{3}H-Uridin: Die Humanlymphozyten wurden wie in 3.2.5.1. für die Rattenlymphozyten beschrieben inkubiert. Die Markierungen der Humanlymphozyten wurden in der Regel wie in 3.2.5.1. beschrieben durchgeführt.

Während der Zeitkinetik des ^{3}H-Thymidineinbaus wurden die Kulturen im Abstand von 24 Stunden für jeweils 24 Stunden markiert. Die eingesetzte Zellzahl betrug 3×10^5 oder 5×10^5 Zellen/Kultur.

Inhibition der Stimulation von Humanlymphozyten mit N-Acetyl-D-Galaktosamin: Zu den Lektinverdünnungsstufen in den Mikrotiterplatten wurden jeweils 10 µl einer sterilen, frisch angesetzten N-Acetyl-D-Galaktosamin-Lösung bestimmter Konzentration zupipettiert und für 60 Minuten bei 37° C vorinkubiert.

Zu den Kontrollkulturen wurden 10 µl RPMI 1640 βPSG Medium zupipettiert. Das Endvolumen betrug nach der Zugabe von 100 µl Zellsuspension 160 µl.

Die Kulturen wurden wie in 3.2.5.1. beschrieben inkubiert und von der 48. bis zur 72. Stunde mit 1 µCi ^{3}H-Thymidin je Zellkultur markiert.

3.2.5.3. Aufarbeitung der Zellkulturen nach der Stimulation

Nach der Bestimmung der Lebendzellzahl (3.2.5.4.) in der Kontrolle des Stimulationsexperiments wurden die Zellkulturen mit einem Mash II-Erntegerät auf Glasfiberfilterstreifen aufgesaugt. Die Streifen wurden zwei Stunden bei 110° C im Trockenschrank getrocknet und die vorgestanzten Filterplättchen in Szintillationsgläschen überführt. Jedes Filterplättchen wurde zwei Stunden mit je 400 µl Gewebelöser (Soluene 350) behandelt. Dann wurden die Proben in 5 ml Szintillationsflüssigkeit im β-Counter gemessen.

3.2.5.4. Vitalitätstest der Zellen mit Trypanblau

Zum Anfärben toter Zellen wurde der Vitalfarbstoff Trypanblau (4,4'-Bis(8-amino-3,6-disulfo-1-hydroxy-2-naphtylazo)-3,3'-dimethylbiphenyl-Na_4-Salz) benutzt. Die Zellsuspension wurde mit einer 0,2 %igen Trypanblau-Lösung in PBS im Verhältnis 1:2 gemischt und die Zellen spätestens nach 5 Minuten in der Neubauer Zählkammer ausgezählt.

Zur Stimulation wurden nur Zellsuspensionen mit hohem Anteil lebender Zellen (95 % oder höher) eingesetzt.

3.2.6. Isolation der Rezeptorproteine für die Limabohnenlektine

Für die Isolierung der Rezeptorsubstanzen wurden Zellen einer etablierten T Zell-Linie eingesetzt, die in ausreichend großen Mengen vermehrt werden können. CCRF-CEM Zellen*) [80] wurden in 250 ml Kulturflaschen im CO_2-Inkubator (5 % CO_2) bei 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellzahl wurde durch wiederholte Zugabe von Medium RPMI 1640 βPSG 10 % FKS täglich auf 1 x 10^6 bis 2 x 10^6 Zellen/ml Medium eingestellt.

Zur Jodierung wurden die CCRF-CEM Zellen 4 mal mit Hanks' Puffer gewaschen, je 2 x 10^7 Zellen in silikonisierten Glasröhrchen abzentrifugiert und in je 40 µl PBS resuspendiert (Zentrifugationsbedingungen beim Waschen der Zellen: Christ-Zentrifuge, 4° C, 15 Minuten, 400 g).

Die Lebendzellzahl wurde mit Trypanblau nach 3.2.5.4. bestimmt und betrug mindestens 98 %.

3.2.6.1. Jodierung der Zellen nach Marchalonis et al. [81]

Zu 2 x 10^7 Zellen/40 µl PBS wurden 20 µl Lactoperoxidaselösung (0,3 mg/ml PBS), 10 µl ^{125}J (entsprechend 1 mCi ^{125}J) und 20 µl H_2O_2 (0,03 %ig) zupipettiert und im Wasserbad bei 30° C für 4 Minuten geschüttelt. Nach erneuter Zugabe von 20 µl der Lactoperoxidaselösung und 20 µl H_2O_2 (0,03 %ig) wurde weitere 3 Minuten bei 30° C inkubiert und die Reaktion dann durch die Zugabe von 10 ml kaltem Phosphatpuffer (PBS) 5 % FKS beendet. Die Zellen wurden bei 4° C, 400 g, 15 Minuten lang abzentrifugiert und 4 mal mit je 5 ml PBS gewaschen.

---

*) Für die freundliche Überlassung der Zellen danke ich Herrn Dr. D. Baron, Medizinische Klinik Tübingen.

3.2.6.2. Solubilisierung der jodierten Membranproteine

Je 2 x 10^7 Zellen wurden mit 200 µl PBS 0,5 % NP 40 1 mM PMSF 100 Minuten im Eis solubilisiert und anschließend 15 Minuten bei 15 000 g, 4° C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 200 µl PBS 0,5% NP 40 1 mM PMSF aufgenommen, weitere 20 Minuten im Eis solubilisiert und wie vorher zentrifugiert. Die Überstände der Zentrifugationen wurden vereinigt und zur Immunpräzipitation, zur Gelelektrophorese, zur Ausbeuteberechnung der Jodierung, sowie zum Auftrag auf die Lima-Sepharose Säule verwendet.

3.2.6.3. Immunpräzipitation der solubilisierten jodierten Membranproteine

200 µl des Zellsolubilisats wurden auf dem Vortex Mixer mit 200 µl einer Limabohnenlektinlösung (PBS, 1 % NP 40, 0,1 mM PMSF) gemischt und für 90 Minuten bei 37° C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl gereinigter Antikörperlösung (in PBS) wurde weitere 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden bei Raumtemperatur (Eppendorf-Tischzentrifuge, 2 Minuten, 2 000 g) abzentrifugiert, 4 mal mit dem Solubilisierungspuffer (37° C) und einmal mit bidestilliertem Wasser gewaschen (Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge 2 Minuten, 2 000 g bei Raumtemperatur). Die Präzipitate wurden lyophilisiert.

Die Überstände der Immunpräzipitationen wurden mit zweifachem Volumen Äthanol im Eis gefällt, noch 3 bis 4 mal mit kaltem Äthanol gewaschen (Zentrifugationen 2 Minuten, 2 000 g) und anschließend getrocknet.

Inhibition der spezifischen Immunpräzipitation mit N-Acetyl-D-Galaktosamin: Zur spezifischen Inhibition der Immunpräzipitation wurde das Limabohnenlektin vor der Zugabe des Zell-

solubilisats für 60 Minuten bei 37° C mit N-Acetyl-D-Galaktosamin in unterschiedlicher Konzentration (10 mM, 50 mM, 100 mM) inkubiert. Sonst wurde wie in 3.2.6.3. beschrieben vorgegangen.

Kontrollen zur Immunpräzipitation:

a) 100 µl des Zellsolubilisats wurden mit 100 µl der Antikörperlösung (3.2.3.) für 90 Minuten bei 37° C und nach Zugabe von 50 µl einer anti-IgG Lösung (anti-Kaninchen-IgG von der Ziege) für weitere 30 Minuten bei 37° C inkubiert.

b) 100 µl des Zellsolubilisats wurde mit 50 µl der Antikörperlösung (3.2.3.) für 120 Minuten bei 37° C inkubiert.

c) 100 µl des Zellsolubilisats wurden mit 100 µl der Limabohnen-Lektinlösung für 120 Minuten bei 37° C inkubiert.

3.2.6.4. Enzymatischer Abbau des markierten Zellsolubilisats

1,8 µl des Zellsolubilisats jodierter Membranproteine aus CEM Zellen (3.2.6.2.) entsprechend 1 x 10^4 cpm wurden mit je 20 µg Thermolysin oder 20 µg Pronase für 3,5 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Kochen (2 Minuten) gestoppt, und die Proben anschließend lyophilisiert.

1,8 µl des Zellsolubilisats jodierter Membranproteine aus CEM Zellen wurde zur Kontrolle ohne Zugabe von Enzym für 3,5 Stunden bei 37° C inkubiert, die Probe ebenfalls 2 Minuten gekocht und dann lyophilisiert.

3.2.6.5. Isolation der Limabohnenrezeptorsubstanz durch Affinitätschromatographie an Lima-Sepharose 6 B

Zum Auftrag auf die Lima-Sepharose 6 B (3.1.5.3.) wurden $3,5 \times 10^9$ CCRF-CEM Zellen 3 mal mit Hank's Puffer unter den üblichen Bedingungen gewaschen und anschließend in 30 ml PBS 0,5 % NP 40 1 mM PMSF für 110 Minuten im Eis unter gelegentlichem Schütteln solubilisiert. Das Sediment der Zentrifugation (15 Minuten, 15 000 g, 4° C) wurde in 10 ml Solubilisierungspuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Überstände der Zentrifugation wurden vereinigt, das Sediment verworfen.

Das Solubilisat aus $3,5 \times 10^9$ Zellen (43,73 ml Gesamtvolumen) wurde mit 1 ml des radiomarkierten Solubilisats aus 3.2.6.2. vereinigt und auf die Lima-Sepharose-Säule aufgetragen.

Das Säulenmaterial war kurz vor dem Auftrag des Solubilisats mit 3 M $MgCl_2$ gespült und dann mit PBS 0,5 % NP 40 0,1 mM PMSF äquilibriert worden.

Nach dem Auftrag des Solubilisats wurde die Säule wie folgt eluiert:

1.	PBS 0,5 % NP 40 0,1 mM PMSF	Fraktionen: 1 - 30 (4,3 ml/Fraktion)
2.	PBS 0,1 mM PMSF	Fraktionen: 31 - 40 (4,3 ml/Fraktion)
3.	PBS 3 M $MgCl_2$ 0,1 mM PMSF	Fraktionen: 41 - 70 (1 ml/Fraktion)
4.	PBS gespült	

Je 100 µl der Fraktionen 1 - 30 (Eluation 1) und je 10 µl der Fraktionen 41 - 70 (Eluation 3) wurden im γ-Counter gezählt.

Die Fraktionen 43 - 63 wurden vereinigt, bei 4° C gegen MEM dialysiert und anschließend in der Amicon-Zelle (Filter YM 10) eingeengt. Die eingeengte und dialysierte Proteinlösung wurde

in den Inhibitionstests der Hämagglutination (3.2.6.7.) eingesetzt.

3.2.6.6. Vorbereitung der Proben für die SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli [73]

a) Die lyophilisierten Immunpräzipitate wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 2 Minuten (vor Auftrag auf das Gel) gekocht.
b) Die Alkohol gefällten Überstände der Immunpräzipitation wurden in SDS-Probenpuffer gelöst und auf das Gel aufgetragen.
c) Ein Aliquot des Zellsolubilisats wurde mit 2-fachem Volumen Äthanol im Eis gefällt, das Sediment (2 Minuten 2 000 g) noch 3 mal mit kaltem Äthanol gewaschen und dann in SDS-Probenpuffer aufgenommen.
d) Die lyophilisierten Proben nach dem proteolytischen Abbau der Proteine (3.2.6.4.) wurden in SDS-Probenpuffer gelöst und 2 Minuten lang erhitzt.
e) Die Proben verschiedener Reinigungsstufen der Limabohnenrezeptorsubstanz von CEM Zellen (3.2.6.5.) wurden gegen bidestilliertes Wasser dialysiert, lyophilisiert und zum Auftrag auf das Gel in SDS-Probenpuffer gelöst.

3.2.6.7. Inhibitionen mit Rezeptorprotein von CCRF-CEM Zellen

a) *Inhibition der Agglutination von Erythrozyten:*
50 µl der nach 3.2.6.5. isolierten und konzentrierten Rezeptorsubstanz wurden mit 50 µl einer Lima 124 Lektinverdünnung mit Titer 2 30 Minuten, und nach Zugabe von 50 µl einer 3 % Erythrozytenlösung A 1, weitere 60 Minuten bei 37° C inkubiert.

b) *Inhibition der Stimulation von Lymphozyten:*
50 µl einer Lima poly I und Lima poly II Verdünnung (165 µg Lektin/Kultur) wurden mit 10 µl der Rezeptorsubstanz bei 37° C für 30 Minuten und nach Zugabe von 100 µl der Zellsuspension für 48 Stunden im CO_2-Inkubator inkubiert und mit 1 µCi ^3H-Thymidin von der 48. - 72. Stunde markiert.

3.2.7. Proteinbestimmungen

3.2.7.1. Proteinbestimmungen durch Messung der optischen Dichte von Proteinlösungen bei 280 nm

Die Proteinbestimmungen der Lektinaufarbeitungen wurden in der Regel durch optische Dichtemessungen der Proben bei 280 nm durchgeführt.

Als Extinktionskoeffizient diente für alle Rohextrakte aus Limabohnen:

$$E^{1\ \%}_{1\ cm} = 1,0$$

Für gereinigte Lektinfraktionen wurde den Berechnungen des Proteingehaltes ein Extinktionskoeffizient von

$$E^{1\ \%}_{1\ cm} = 1,23\ [21]$$

zugrunde gelegt.
Nullwert war der jeweilige Probenpuffer der Proteinlösung.

3.2.7.2. Proteinbestimmungen nach Lowry [82]

Der Proteingehalt aller anderen Proben wurde nach Lowry mit RSA als Standard bestimmt. Als Nullwert diente ein Ansatz mit dem jeweiligen Probenpuffer. Als Eichwert wurde die $OD_{578\ nm}$ von 25 µg RSA im Puffer der zu bestimmenden Proteinlösung benutzt.

Proteinproben, die NP 40 enthielten, wurden vor der Messung der optischen Dichte 2 Minuten bei 2 000 g zentrifugiert.

3.2.8. Färbung der Polyacrylamidgele

Die Färbung der Rundgele nach der isoekektrischen Fokussierung und der SDS-Flachgele wurde nach der folgenden Methode durchgeführt [83]:

12 Stunden in Färbelösung 1:	10 % Essigsäure 25 % Isopropanol 300 mg Coomassie Blau/ 1 Liter Wasser
12 Stunden in Färbelösung 2:	10 % Essigsäure 10 % Isopropanol 30 mg Coomassie Blau/ 1 Liter Wasser
12 Stunden in Färbelösung 3:	10 % Essigsäure 10 mg Coomassie Blau/ 1 Liter Wasser

Das Gel wurde in 10 % Essigsäure weiter entfärbt.

3.2.9. Autoradiographie jodierter Membranproteine

Jodierte Membranproteine wurden nach der SDS-Gelelektrophorese mit Hilfe der Autoradiographie sichtbar gemacht. Die vollständig getrockneten Polyacrylamidgele und ein Röntgenfilm (X Omat R x R 5) wurden in einer Röntgenfilmkassette mit Verstärkerfolie bei -70° C für unterschiedlich lange Zeit exponiert. Die Expositionszeiten sind in den Legenden der einzelnen Abbildungen angegeben. Die Röntgenfilme wurden nach Vorschrift der Firma Kodak entwickelt und fixiert.

4. ERGEBNISSE

4.1. Isolation der Limabohnenlektine

60 g Limabohnen wurden wie in 3.2.1.1. und 3.2.1.2. beschrieben homogenisiert und durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung vorgereinigt.

Die an die Fällung anschließenden affinitätschromatographischen Reinigungsschritte mit ConA-Sepharose 4 B (3.1.5.4.) oder GalN-Sepharose 4 B (3.1.5.1.), sowie die Trennung der Isolektine Lima poly I, Lima poly II, Lima 247 und Lima 124 durch Gelpermeationschromatographie über eine Sephadex G 200 superfine Säule (3.1.5.5.) sind in den folgenden Abbildungen 1 bis 4 und der Tabelle 1 dargestellt.

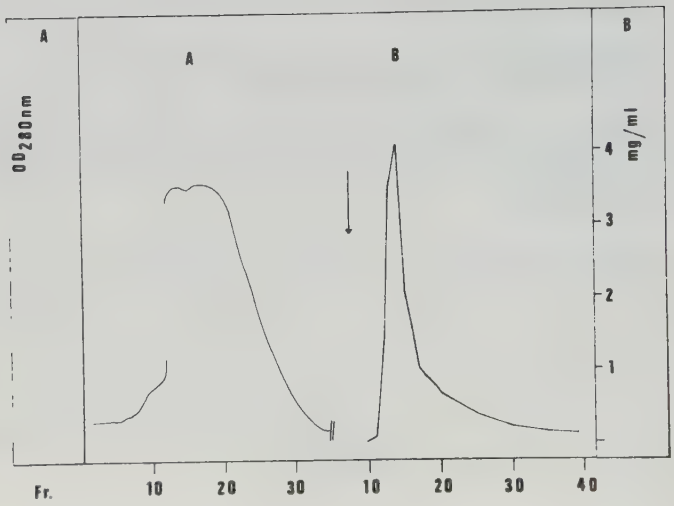


Abb. 1: Affinitätschromatographie eines durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung vorgereinigten Limabohnenextraktes an ConA-Sepharose 4 B

Auftrag auf die Säule:	783 mg Protein in 14,5 ml 50 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF
Eluation:	A 50 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF B 200 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF 0,1 M α-Methyl-Mannosid
——	Proteingehalt
—>	Start der Eluation mit 0,1 M α-Methyl-Mannosid
Koordinatenbezeichnung:	Abszisse: Fraktionen Ordinate: Proteingehalt mg/ml oder OD_{280}

Abbildung 2 zeigt das Elutionsprofil der Lektintrennung von Lima poly I, Lima poly II, Lima 247 und Lima 124 über eine Sephadex G 200 superfine Säule. Die Lektinfraktion war vorher affinitätschromatographisch mit ConA-Sepharose 4 B (Abb. 1) gereinigt worden.

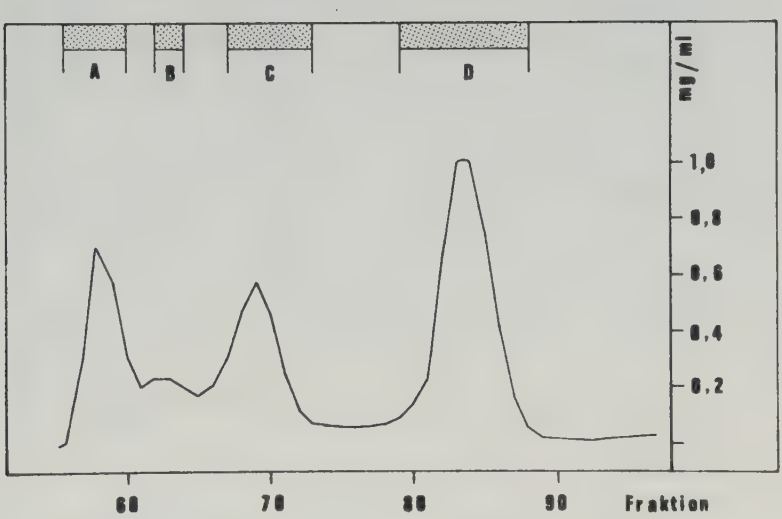


Abb. 2: Gelpermeationschromatographie einer vorher mit ConA-Sepharose 4 B gereinigten Lektinfraktion an Sephadex G 200 superfine

Auftrag auf die Säule:	120 mg Protein in 3,3 ml 200 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF	
Eluation:	200 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF	
Vereinigte Fraktionen:	A	Lima poly I 19,5 % des Gesamtproteins
	B	Lima poly II 6,8 % des Gesamtproteins
	C	Lima 247 23,8 % des Gesamtproteins
	D	Lima 124 49,9 % des Gesamtproteins
Ausbeute der Säuleneluation:	70 %	
Koordinaten-bezeichnung:	Abszisse: Fraktionen Ordinate: Proteingehalt mg/ml	

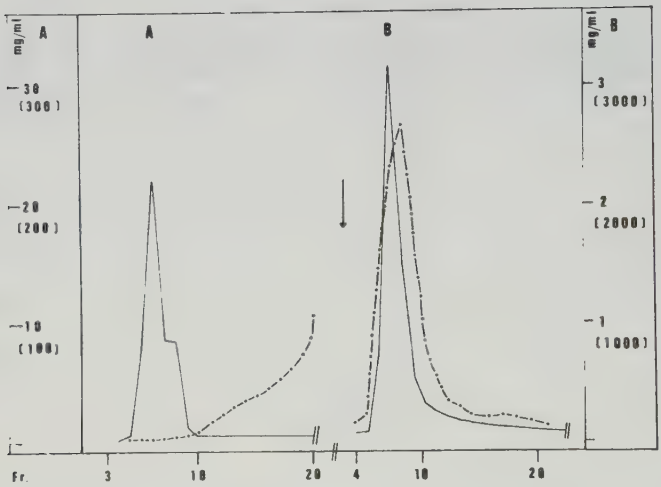


Abb. 3: Affinitätschromatographie eines durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung vorgereinigten Limabohnenextraktes an GalN-Sepharose 4 B

Auftrag auf die Säule:	800 mg Protein in 24 ml 50 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF
Eluation:	A 50 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF B 200 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF 1 M Galaktose
———	Proteingehalt (mg/ml)
.-.-.	HA-spezifische Aktivität $[\frac{\text{Titer}}{\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}}]$
——>	Start der Eluation mit 1 M Galaktose
Koordinatenbezeichnung:	Abszisse: Fraktionen Ordinate: Proteingehalt mg/ml [HA-spezifische Aktivität]

Abbildung 4 zeigt das Elutionsprofil der Lektintrennung in Lima poly I, Lima poly II, Lima 247 und Lima 124 über eine Sephadex G 200 superfine Säule. Die Lektinfraktion war vorher affinitätschromatographisch mit GalN-Sepharose 4 B (Abb. 3) gereinigt worden.

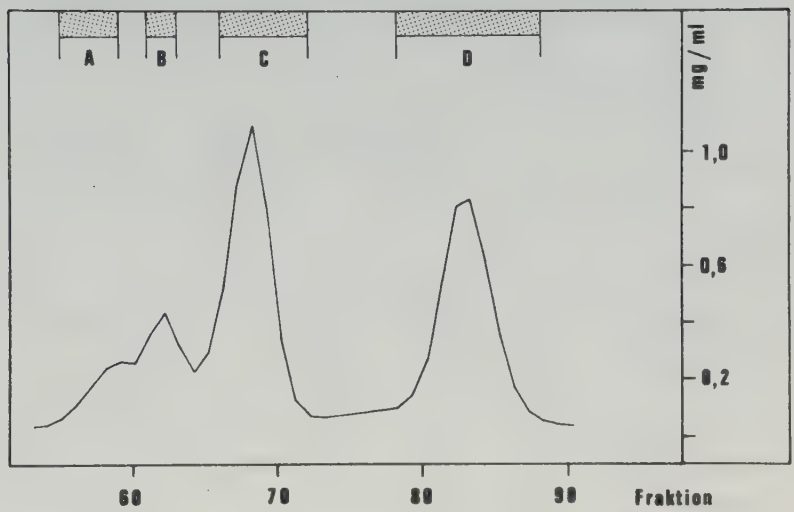


Abb. 4: Gelpermeationschromatographie einer vorher mit GalN-Sepharose 4 B gereinigten Lektinfraktion an Sephadex G 200 superfine

Auftrag auf die Säule:	90 mg Protein in 4,2 ml 200 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF	
Eluation:	200 mM Lektinpuffer 0,1 mM PMSF	
Vereinigte Fraktionen:	A	Lima poly I 7,2 % des Gesamtproteins
	B	Lima poly II 15,8 % des Gesamtproteins
	C	Lima 247 46,7 % des Gesamtproteins
	D	Lima 124 30,3 % des Gesamtproteins
Ausbeute der Säuleneluation:	75 %	
Koordinaten-bezeichnung:	Abszisse: Fraktionen Ordinate: Proteingehalt mg/ml	

In der Tabelle 1 sind Daten einer typischen Lektinaufarbeitung mit affinitätschromatographischer Reinigung der Limabohnenlektinfraktion über GalN-Sepharose 4 B zusammengestellt.

Tabelle 1: Daten einer Lektinaufarbeitung mit affinitätschromatographischer Reinigung an GalN-Sepharose 4 B

Lektinreinigungsstufe	Volumen (ml)	Protein (mg)	Spez. HA ($\frac{\text{Titer}}{\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}}$)	Reinigungsfaktor	Anteil am Gesamtprotein (%)
Limabohnen Aufschluß (Filtrat)	455	22 570	10	0	
Überstand der 1. Zentrifugation	435	15 050	15	1,5	
Überstand der 2. Zentrifugation	458	5 220	23	2,3	
Überstand der 3. Zentrifugation	468	4 070	0,2	-	
Sediment der 3. Zentrifugation	24	800	164	16	
GalN-Sepharose nicht bindende Fraktionen	418	706	5	-	
GalN-Sepharose bindende Fraktionen (Galaktose Eluat)	241	94	2 188	219	
Lima poly I	39,6	4,35	2 133	213	7,2
Lima poly II	29,5	9,52	3 103	310	15,8
Lima 247	57,9	28,16	1 458	146	46,7
Lima 124	112,3	18,25	71	7	30,3

Vergleicht man die Ausbeuten der einzelnen Limabohnen-Isolektine nach der affinitätschromatographischen Reinigung mit ConA-Sepharose 4 B und mit GalNac-Sepharose 4 B, so werden deutliche Unterschiede der Reinigungsspezifität sichtbar. Die Daten nach der Gelpermeation über eine Sephadex G 200 superfine Säule sind noch einmal vergleichend gegenübergestellt:

Isolektin	Anteil am Gesamtlektin (%)	
	nach ConA-Sepharose 4 B	nach GalNac-Sepharose 4 B
Lima poly I	19,5	7,2
Lima poly II	6,8	15,8
Lima 247	23,8	46,7
Lima 124	49,9	30,3

4.2. Reinheitskontrollen

4.2.1. SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli

Zur Reinheitskontrolle der an ConA-Sepharose 4 B affinitätschromatographisch gebundenen und spezifisch mit α-Methyl-Mannosid eluierten Lektinfraktionen wurden Proben der Isolektine (nach ihrer Molekulargewichtstrennung über eine Sephadex G 200 superfine Säule) gegen bidestilliertes Wasser dialysiert, lyophilisiert und in SDS-Probenpuffer nach Laemmli aufgenommen. Die Proben wurden direkt vor dem Auftrag auf das Gel gekocht (2 Minuten, 100° C).

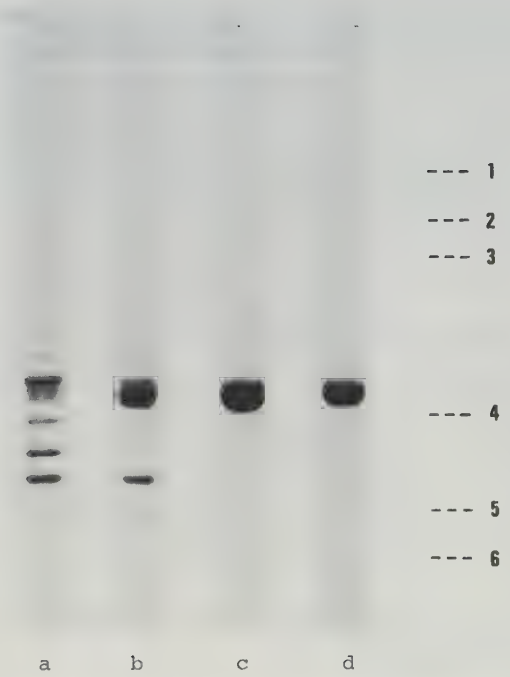


Abb. 5: Limabohnen-Isolektine nach einer affinitätschromatographischen Reinigung mit ConA-Sepharose 4 B; Elektropherogramme der mit Coomassie Brilliantblau angefärbten Proteinbanden

a Lima poly I
b Lima poly II
c Lima 247
d Lima 124

Bedingungen der Gelelektrophorese:
SDS Gelelektrophorese nach Laemmli
Gradienten-Flachgel 5 - 15 % Acrylamidkonzentration
Elektrophoresedauer 5 Stunden bei 12 mA konstant

—> Markerproteine: (1) RSA,
(2) IgG,
(3) Ovalbumin,
(4) Chymotrypsinogen,
(5) β-Lactoglobulin,
(6) Cytochrom C

In der Abbildung 5 sind die mit ConA-Sepharose 4 B gereinigten Limabohnenlektine nach der SDS-Gelelektrophorese dargestellt: es ist deutlich, daß insbesondere Lima poly I (Abb. 5a) und Lima poly II (Abb. 5b) noch stark mit Fremdprotein verunreinigt sind. Die Lima poly I-Fraktion enthält nur zu geringem Anteil Limabohnenlektin.

Die Reinigungskapazität der ConA-Sepharose 4 B sollte mit der nach Allen und Neuberger [71] synthetisierten GalNac-Sepharose 4 B (3.1.5.1.) verglichen werden. Deshalb wurden zur Kontrolle der Lektinpräparationen nach jedem Reinigungsschritt der Aufarbeitung mit affinitätschromatographischer Reinigung der Lektine an GalN-Sepharose 4 B Proben zur SDS-Gelelektrophorese (wie vorher beschrieben) vorbereitet.

In der folgenden Abbildung 6 sind die einzelnen Reinigungsstufen der Limabohnen-Lektinpräparation dargestellt. Die Lektine Lima poly I, Lima poly II, Lima 247 und Lima 124 (Abb. 6h-k) sind von großer Reinheit. Die Isolektine spalten in Gegenwart von SDS und 2-Mercaptoäthanol in ihre identischen Untereinheiten mit dem Molekulargewicht 31 000. Ein Teil der Lektine wurde von der GalN-Sepharose nicht spezifisch gebunden und mit 50 mM Lektinpuffer eluiert (Abb. 8f).

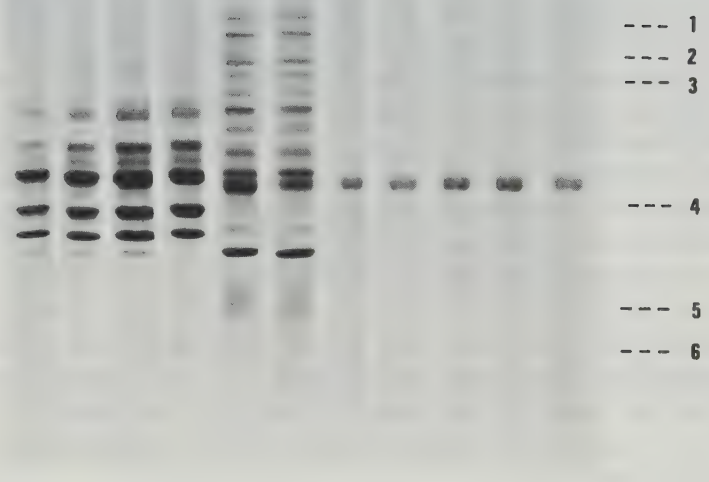


Abb. 6: Limabohnen-Lektinreinigung mit affinitätschromatographischer Reinigung an GalN-Sepharose 4 B; Elektropherogramme der mit Coomassie Brilliantblau angefärbten Proteinbanden

a Limabohnen Aufschluß
b Überstand der 1. Zentrifugation
c Überstand der 2. Zentrifugation
d Überstand der 3. Zentrifugation
e Sediment der 3. Zentrifugation
f GalN-Sepharose Säule nicht bindende Fraktion
g GalN-Sepharose Säule bindende Fraktion
h Lima poly I nach der Gelpermeationschromatographie
i Lima poly II nach der Gelpermeationschromatographie
k Lima 247 nach der Gelpermeationschromatographie
l Lima 124 nach der Gelpermeationschromatographie

Bedingungen der Gelelektrophorese:
SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli
Gradienten-Flachgel 5 - 15 % Acrylamidkonzentration
Elektrophoresedauer 5 Stunden bei 12 mA konstant

—> Markerproteine: (1) RSA,
(2) IgG,
(3) Ovalbumin,
(4) Chymotrypsinogen
(5) β-Lactoglobulin
(6) Cytochrom C

4.2.2. Isoelektrische Fokussierung der Isolektine

Die Lektine Lima poly I, Lima poly II, Lima 247 und Lima 124 wurden wie in 3.2.2.2. beschrieben fokussiert. Die Abbildungen zeigen die Scanner-Diagramme der fokussierten und mit Coomassie Brilliantblau gefärbten Proteinbanden.

Die Diagramme machen deutlich, daß die Limabohnenlektine trotz der Reinheit in der SDS-Gelelektrophorese keine homogenen Substanzen darstellen; sie spalten vielmehr im pH-Bereich von 4,7 bis 6,0 und 6,3 bis 7,5 in mehrere Proteinbanden auf. Die Heterogenität ist dabei unabhängig von der Art der affinitätschromatographischen Reinigung der Isolektine.

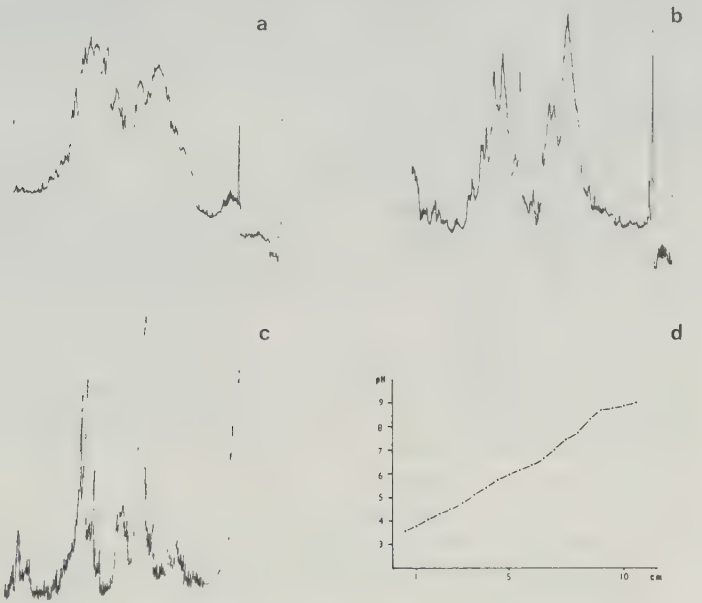


Abb. 7: Scanner-Diagramme der Rundgele nach der isoelektrischen Fokussierung der affinitätschromatographisch mit ConA-Sepharose 4 B gereinigten Isolektine

a Lima poly I
b Lima poly II
c Lima 247
d Eichgerade

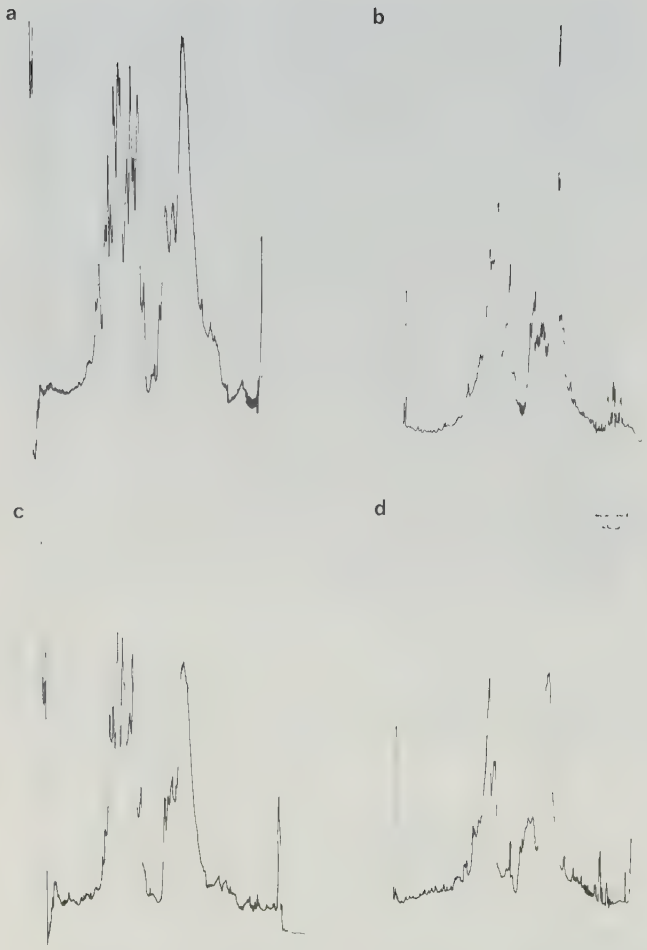


Abb. 8: Scanner-Diagramme der Rundgele nach der isoelektrischen Fokussierung der affinitätschromatographisch mit GalN-Sepharose 4 B gereinigten Isolektine

a Lima poly I
b Lima poly II
c Lima 247
d Lima 124

4.2.3. Analytische Ultrazentrifugation

In der Abbildung 9a-c sind die Sedimentationsdiagramme der gereinigten Isolektine dargestellt. Die Lektine Lima poly I, Lima poly II, Lima 247 und Lima 124 waren affinitätschromatographisch mit GalN-Sepharose 4 B gereinigt und über Sephadex G 200 superfine nach Molekulargewicht getrennt worden. Die Sedimentationskonstanten sind in der Tabelle 2 zusammengestellt; nähere Angaben zur analytischen Ultrazentrifugation in den Legenden der Abbildungen.

Tabelle 2: Sedimentationskonstanten der Limabohnen-Lektine

Lektin/ Versuchsnummer	Protein-konzentration	$S_{20,w}$
Lima poly I / 102	5,48 mg/ml	13,74
Lima poly I / 101	4,54 mg/ml	13,48 / 5,8
Lima poly II / 101	3,76 mg/ml	11,78 / 9,94
Lima poly II / 102	5,85 mg/ml	11,97
Lima 247 / 101	4,0 mg/ml	9,88
Lima 124 / 101	2,0 mg/ml	6,26

Aus den Daten der Tabelle 2 und den Abbildungen der Sedimentationsdiagramme geht hervor, daß die Lektine Lima poly I und Lima poly II der Aufarbeitung mit der Labornummer 101 keine einheitliche Substanz darstellen. Bei der Substanz mit dem $S_{20,W}$-Wert 5,8 in der Lima poly I-Präparation handelt es sich um eine Verunreinigung mit Fremdprotein aus der Aufarbeitung. Der Substanzpeak mit dem $S_{20,W}$-Wert 9,94 in der Lima poly II-Präparation repräsentiert wahrscheinlich Lima 247 ($S_{20,w}$ 9,88), das in dem G 200 superfine Säulenlauf nur ungenügend von Lima poly II abgetrennt wurde.

Abb. 9a: Analytische Ultrazentrifugation:
Sedimentationsdiagramme von Lima poly I 101 und 102

Die fotografischen Aufnahmen wurden zu folgenden Zeiten des Zentrifugenlaufs gemacht: 0, 30, 45, 55, 60, 75, 85 Minuten. Das erste Foto wurde bei Erreichen der Zentrifugationsgeschwindigkeit (44 770 Upm) aufgenommen.

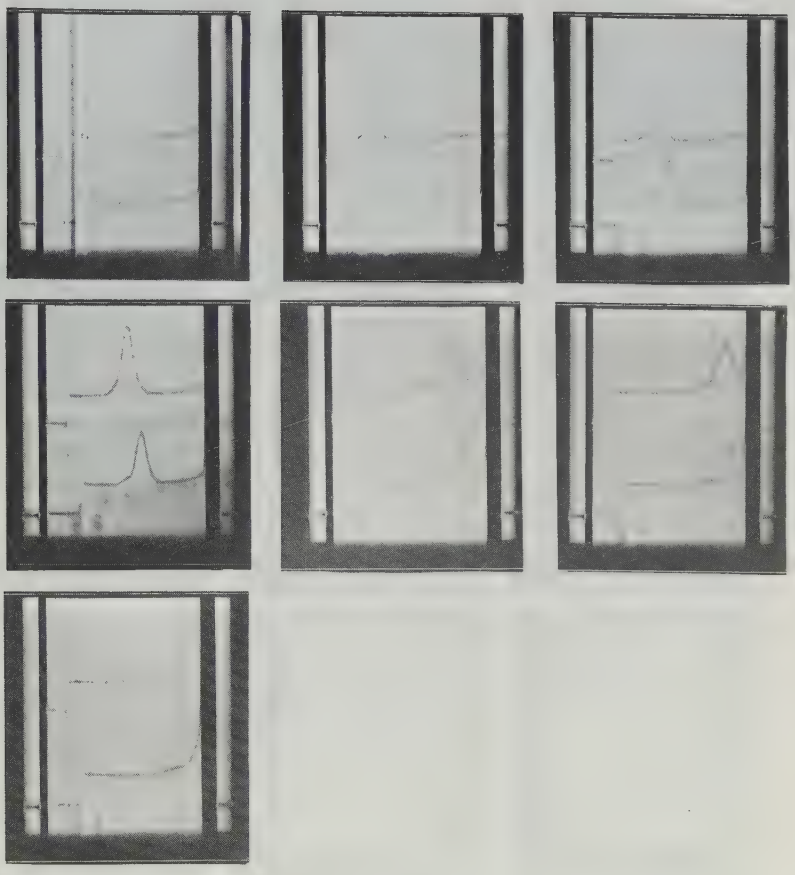


Abb. 9b: Analytische Ultrazentrifugation:
Sedimentationsdiagramme von Lima poly II 101 und 102

Die fotografischen Aufnahmen wurden zu folgenden Zeiten des Zentrifugenlaufs gemacht: 0, 15, 30, 45, 55, 90, 100 Minuten. Das erste Foto wurde bei Erreichen der Zentrifugationsgeschwindigkeit (44 770 Upm) aufgenommen.

Abb. 9c: Analytische Ultrazentrifugation:
Sedimentationsdiagramme von Lima 247 und Lima 124/101

Die fotografischen Aufnahmen wurden zu folgenden Zeiten des Zentrifugenlaufs gemacht: 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 125 Minuten.
Das erste Foto wurde bei Erreichen der Zentrifugationsgeschwindigkeit (44 770 Upm) aufgenommen.

4.2.4. Aminosäureanalyse gereinigter Limabohnen-Isolektine nach affinitätschromatographischer Reinigung an ConA-Sepharose und GalN-Sepharose

Als weiteres Reinheitskriterium wurden die Daten der Aminosäurenanalyse der gereinigten Limabohnen-Isolektine Lima poly I, Lima poly II, Lima 247 und Lima 124 herangezogen.

Die Lektine waren vor der Hydrolyse mit ConA-Sepharose oder mit GalN-Sepharose affinitätschromatographisch gereinigt worden.

In den folgenden Tabellen 3 bis 5 sind die Ergebnisse der Aminosäurenanalysen der Isolektine zusammengefaßt. Die Lektine nach der Reinigung der GalN-Sepharose 4 B wurden nach saurer Hydrolyse mit 6N HCl, die Proteine nach der Reinigung mit ConA-Sepharose 4 B wurden nach saurer Hydrolyse mit 6N HCl, sowie nach Perameisensäureoxidation und Hydrolyse mit 6N HCl analysiert.

Vergleicht man die Aminosäurenzusammensetzung der einzelnen Isolektine einer Aufarbeitung, so zeigt sich eine gute Übereinstimmung der Werte für Lima poly II, Lima 247 und Lima 124. Lima poly I zeigt Abweichungen vor allem für die basischen Aminosäuren Lysin, Histidin und Arginin, sowie für Asparaginsäure und Glutaminsäure, und in geringem Umfang für Prolin. Threonin ist im Vergleich zu Lima poly II, Lima 247 und Lima 124 in geringeren Konzentrationen nachweisbar. Methionin und Cystein wurden für alle Isolektine nach der affinitätschromatographischen Reinigung mit ConA-Sepharose nachgewiesen; nach der Reinigung mit GalN-Sepharose konnte Methionin nur in der Lima poly I-Fraktion identifiziert werden.

Die für die Aminosäuren berechneten Molaritäten wurden auf den von Gould und Scheinberg publizierten Wert für Alanin (15,5 Mol/31 000 g Protein; Komponente III) bezogen [21].

Tabelle 3: Ergebnisse der Aminosäurenanalyse der mit ConA-Sepharose 4 B gereinigten Limabohnen-Isolektine Analyse nach saurer Hydrolyse

Aminosäure	Mol/31 000 g Protein			
	Lima poly I	Lima poly II	Lima 247	Lima 124
Lys	18,8	12,3	12,6	10,4
His	11,6	4,2	4,5	2,5
Arg	8,5	3,6	3,3	1,9
Asp	25,8	21,2	21,9	20,0
Thr	9,2	11,3	11,6	11,5
Ser	19,5	20,6	21,1	20,6
Glu	40,2	14,4	13,5	11,8
Pro	22,3	8,2	11,8	9,9
Gly	18,6	14,0	13,6	14,0
Ala	15,5	15,5	15,5	15,5
Cys[1)]	+	+	+	+
Val	18,3	15,2	14,7	13,5
Met	1,6	+	+	(+)
Ile	11,8	9,2	9,5	8,2
Leu	26,8	20,2	20,9	19,2
Tyr	7,3	4,8	5,4	4,2
Phe	11,3	12,4	13,2	12,0
GlcN[2)]	0,8	1,7	2,3	1,7

1) Cystein wurde als Cysteinsäure nachgewiesen

2) Glukosamin wurde bei der Berechnung auf Lysin bezogen

(+) nur schwach nachweisbar

Tabelle 4: Ergebnisse der Aminosäurenanalyse der mit ConA-Sepharose 4 B gereinigten Limabohnen-Isolektine Analyse nach Perameisensäureoxidation und saurer Hydrolyse

Aminosäure	Mol/31 000 g Protein			
	Lima poly I	Lima poly II	Lima 247	Lima 124
Lys	18,2	16,3	11,3	11,6
His	7,6	6,0	3,3	3,4
Arg	9,8	5,4	3,4	4,0
Asp	27,8	22,8	20,2	20,8
Thr	9,3	10,4	10,4	11,0
Ser	28,7	28,2	22,9	24,8
Glu	34,6	23,6	16,3	15,5
Pro	16,3	13,3	12,6	11,8
Gly	26,2	23,4	35,8	22,2
Ala	15,5	15,5	15,5	15,5
Cys[1)]	+	+	+	+
Val	11,9	11,3	11,6	11,3
Met[2)]	+	(+)	(+)	(+)
Ile	11,3	9,0	8,4	8,9
Leu	18,0	17,5	18,6	19,1
Tyr[3)]	-	-	-	-
Phe	10,4	9,0	10,5	11,0
GlcN[4)]	3,9	3,0	3,1	2,6

1) Cystein wurde als Cysteinsäure nachgewiesen

2) Methionin wurde als Methioninsulfonsäure nachgewiesen

3) Tyrosin nicht nachweisbar

4) Glukosamin wurde bei der Berechnung auf Lysin bezogen

Tabelle 5: Ergebnisse der Aminosäurenanalyse der mit GalN-Sepharose gereinigten Limabohnen-Isolektine
Analyse nach saurer Hydrolyse der Proteine

Aminosäuren	Mol/31 000 g Protein			
	Lima poly I	Lima poly II	Lima 247	Lima 124
Lys	19,5	11,9	11,5	12,3
His	10,5	4,7	3,9	4,3
Arg	7,8	2,8	1,7	1,9
Asp	23,9	21,1	20,2	23,7
Thr	9,8	12,4	11,7	14,0
Ser	19,4	21,9	20,6	24,3
Glu	31,0	13,2	11,6	13,8
Pro	14,9	11,6	9,3	14,1
Gly	17,0	14,3	13,3	14,0
Ala	15,5	15,5	15,5	15,5
Cys[1)]	-	+	+	+
Val	17,7	14,1	14,7	17,4
Met	(+)	-	-	-
Ile	9,5	11,6	9,8	9,9
Leu	21,9	24,5	20,8	22,6
Tyr	5,9	5,1	4,8	5,1
Phe	11,8	13,8	12,9	14,1
GlcN[2)]	1,6	2,3	2,0	2,2

1) Cystein wurde als Cysteinsäure nachgewiesen

2) Glukosamin wurde bei der Berechnung auf Lysin bezogen

(+) nur schwach nachweisbar

4.2.5. Ouchterlony-Diffusionstest der Limabohnen-Isolektine gegen anti-Lima-247-Antiserum vom Kaninchen

Zur Reinheitskontrolle der Lektinpräparation wurde ein Diffusionstest nach Ouchterlony durchgeführt [76]. Die Versuchsbedingungen sind in 3.2.2.5. beschrieben.

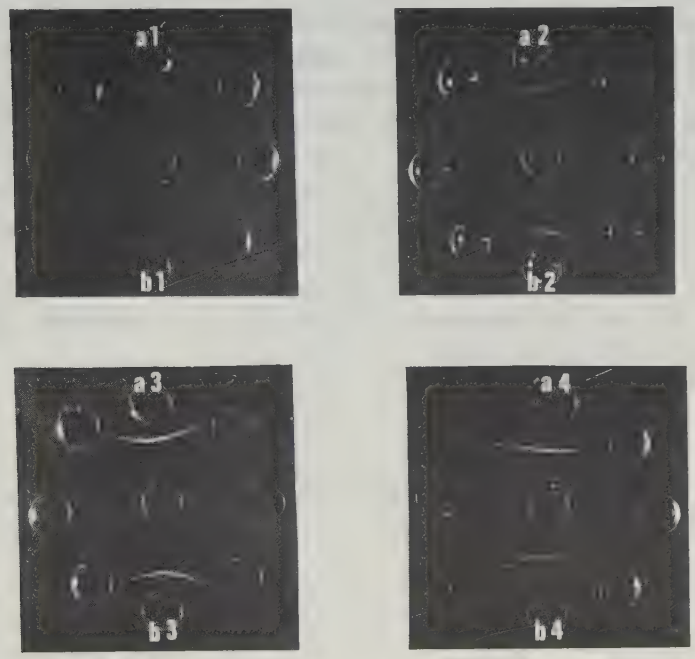


Abb. 10: Einfache radiale Diffusion der Isolektine gegen ein anti-Lima-247-Antiserum

Auftrag: in die mittlere Vertiefung: anti-Lima-247-Antiserum (60 µg/Vertiefung)
in die äußeren Vertiefungen: Limabohnen-Isolektine (bezeichnet mit a bzw. b) (10 µg/Vertiefung)

a1	Lima poly I	Die Lektine a1 - a4 wurden affi-
a2	Lima poly II	nitätschromatographisch mit
a3	Lima 247	ConA-Sepharose 4 B gereinigt.
a4	Lima 124	
b1	Lima poly I	Die Lektine b1 - b4 wurden mit
b2	Lima poly II	GalN-Sepharose 4 B gereinigt.
b3	Lima 247	
b4	Lima 124	

Die Limabohnenlektine unterschiedlichen Molekulargewichts werden je nach der Art der Reinigung und der Höhe des Aggregationszustands unterschiedlich gut von einem Antiserum gegen Lima 247 (4.3.) präzipitiert.

Die Höhe des Molekulargewichts ist für die Diffusionsgeschwindigkeit der Proteine im Agar und damit für die Lage der Präzipitationsbanden verantwortlich. Das Limabohnenlektin mit dem kleinsten Molekulargewicht (Lima 124) wandert bis zur Präzipitation durch den spezifischen Antikörper am weitesten, das hochmolekulare Lima poly I am wenigsten weit vom Auftragspunkt weg.

Besonders scharf sind die Präzipitationslinien des Antiserums mit Lima 247, Lima 124 und Lima poly II ausgebildet; sehr schwach ist dagegen die Präzipitatbildung mit Lima poly I, das affinitätschromatographisch an ConA-Sepharose gereinigt wurde (Abb. 10a1).

4.3. Isolation und Reinigung eines Antiserums gegen Lima 247

Zu den in 3.2.6.3. und 4.6.2. beschriebenen Versuchen der Rezeptorisolation für Limabohnenlektine mußten spezifisch gegen Limabohnenlektin gerichtete Antikörper möglichst sauber hergestellt werden.

Im folgenden werden die Ergebnisse der Reinigung der IgG-Fraktion aus dem Serum dargestellt, sowie die Ergebnisse der Reinheits- und Aktivitätskontrollen zusammengefaßt.

4.3.1. Affinitätschromatographische Reinigung der Antikörperfraktion mit Lima-Sepharose 4 B

Das Serum wurde wie im Material- und Methoden-Teil der Arbeit beschrieben hergestellt (3.2.3.) und zum Auftrag auf die Affinitätssäule Lima-Sepharose 4 B vorbereitet.

Abbildung 11 zeigt das Elutionsprofil ($OD_{280\ nm}$) der spezifischen Reinigung einer Antikörperfraktion aus einem anti-Lima-247-Antiserum. Die an die modifizierte Sepharose nicht bindende Serumfraktion wurde zunächst mit PBS (Abb. 11, Eluat 1) ausgespült und anschließend die stark bindende Antikörperfraktion mit einem Puffer hoher Ionenstärke unspezifisch eluiert (Abb. 11, Eluat 3).

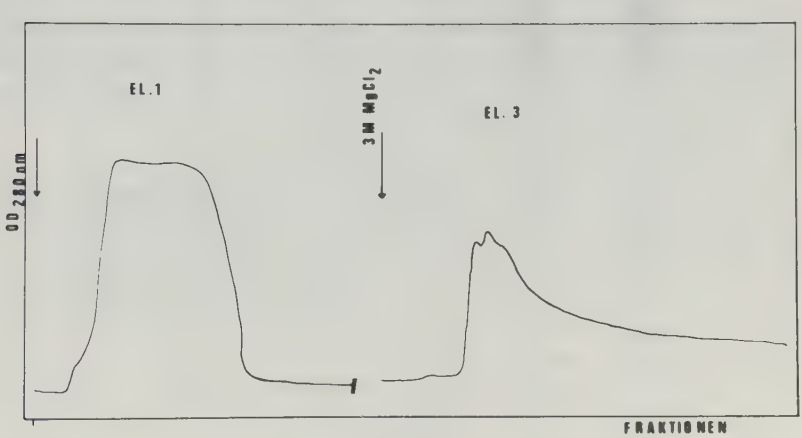


Abb. 11: Elutionsprofil der spezifischen Reinigung einer Antikörperfraktion aus Antiserum gegen Lima 247

Auftrag auf die Säule:	1 633,2 mg Protein gesamt in 33 ml Serum
Elution:	1. PBS (1 011,7 mg Protein in Eluat 1) 2. TKM 3. TKM 3 M $MgCl_2$
Fraktionen:	Säuleneluation 1 und 2 50 Min. 11 ml Säuleneluation 3 10 Min. 2,2 ml

4.3.2. SDS-Gelelektrophorese des Antiserums und der gereinigten Antikörper gegen Lima 247

Proben des frisch entnommenen Antiserums und der Fraktionen des Säulenlaufs (4.3.1.) wurden gegen bidestilliertes Wasser dialysiert, lyophilisiert und in SDS-Probenpuffer vor dem Auftrag auf das Flachgel zwei Minuten gekocht. Als Marker für die IgG-Fraktion wurde gereinigtes anti-β_2-Mikroglobulin (Medac) aufgetragen.

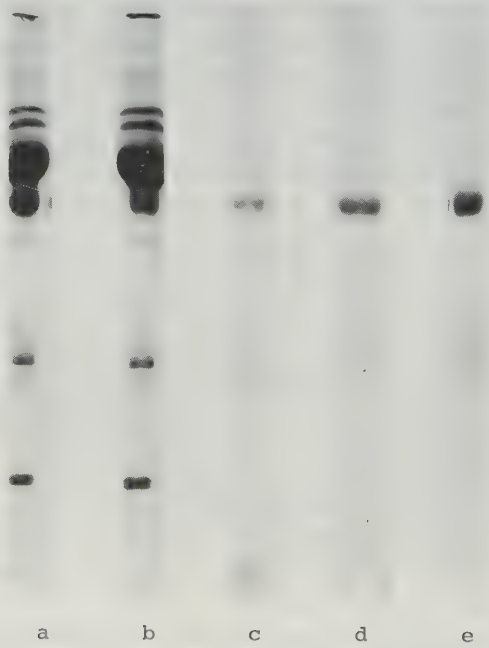


Abb. 12: Elektropherogramm der Coomassie Brilliantblau gefärbten Proteinbanden: gereinigte und ungereinigte Antiserumfraktionen

a ungereinigtes Antiserum
b Lima-Sepharose 4 B nicht bindende Antiserumfraktion
c Lima-Sepharose 4 B bindende Antiserumfraktion
d Lima-Sepharose 4 B bindende Antiserumfraktion
e anti-β_2-Mikroglobulin IgG

Bedingungen der Gelelektrophorese: siehe Abb. 5

Die Gelelektrophorese zeigt, daß schon nach einmaliger Bindung an Lima-Sepharose 4 B (4.3.1.) die Antikörperfraktion, die spezifisch gegen Lima 247 gerichtet ist, gereinigt werden konnte (Abb. 12c,d). Ein Teil der IgG-Fraktion wurde von der Lima-Sepharose 4 B nicht gebunden (Abb. 12b).

4.3.3. Ouchterlony-Diffusionstest der gereinigten und ungereinigten Antiserumfraktionen

Der Ouchterlony-Diffusionstest wurde zur Aktivitätskontrolle der verschiedenen gereinigten und ungereinigten Serumfraktionen durchgeführt.

Die im Test eingesetzten Lektine waren affinitätschromatographisch mit GalN-Sepharose gereinigt und mit PBS auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt.

a) Die ungereinigte Serumfraktion (Abb. 13, 1a-4a) wurde unverdünnt eingesetzt (49,5 mg Protein/ml Serum).
b) Die Lima-Sepharose 4 B nicht bindenden Fraktionen der Säuleneluation wurden vereinigt (4,6 mg Protein/ml Eluat 1). 10 µl dieser Fraktion wurden in die Vertiefung der Agarplatte einpipettiert (Abb. 13, 1b-4b).
c) Die Lima-Sepharose bindenden Antikörperfraktionen wurden nach der Eluation mit $MgCl_2$ wie in 3.2.3.1. beschrieben vereinigt, dialysiert und eingeengt. 10 µl der eingeengten Proteinlösung (3,9 mg Protein/ml PBS) wurden im Diffusionstest eingesetzt (Abb. 13, 1c-4c).

Eine spezifische Immunpräzipitation ist für alle Limabohnen-Isolektine nachzuweisen. Die präzipitierende Aktivität besitzen jedoch nur die ungereinigten Antiserumfraktionen und die Lima-Sepharose bindenden IgG-Fraktionen des Antiserums, sowie die aus dieser IgG-Fraktion hergestellten $F(ab')_2$-Fragmente (Abb. 13, d 1-4). Die nicht bindende Serumfraktion enthält nachweislich keine gegen Limalektine gerichteten Antikörpermoleküle mehr.

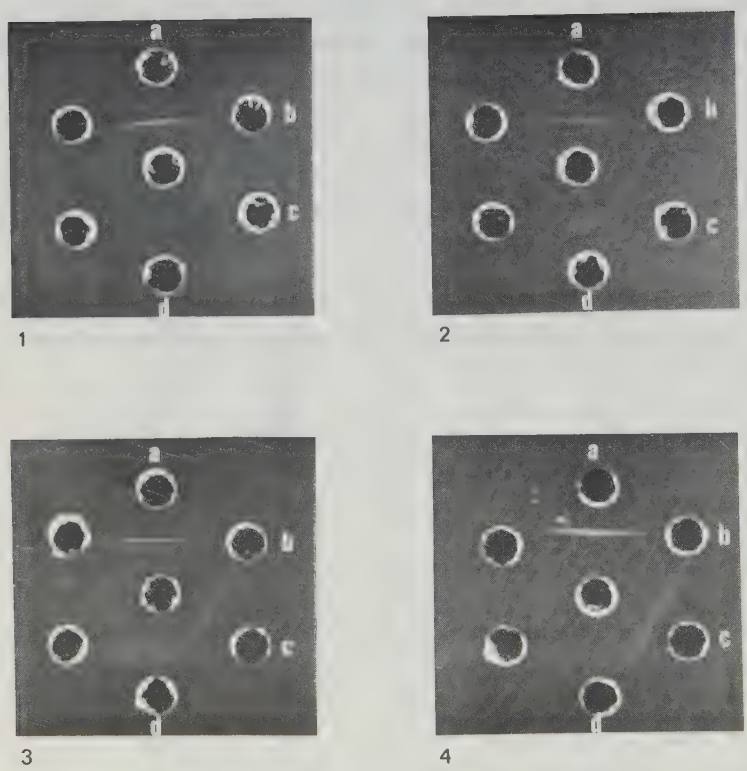


Abb. 13: Einfache radiale Diffusion der gereinigten und ungereinigten Antiserumfraktionen gegen Limabohnen-Isolektine

a ungereinigtes Antiserum (10 µl Auftrag)
b Lima-Sepharose 4 B nicht bindende Serumfraktionen (10 µl Auftrag)
c Lima-Sepharose 4 B bindende Serumfraktion (10 µl Auftrag)
d $F(ab')_2$-Fragmente der mit Pepsin verdauten Antikörper-Fraktion (Eluat 3, Abb. 11) gegen Lima 247

1 Lima poly I (10 µg)
2 Lima poly II (10 µg)
3 Lima 247 (10 µg)
4 Lima 124 (10 µg)

4.4. Hämagglutinationstest mit Limabohnen-Isolektinen

Die Hämagglutinationstests und die Hämagglutinations-Inhibitionstests wurden wie in 3.2.4. beschrieben durchgeführt. Die Hämagglutinationstests dienten vor allem der Kontrolle der Anreicherung des Limabohnenlektins während der Aufarbeitung aus Limabohnen und der Charakterisierung der biologischen Eigenschaften verschiedener Isolektine.

4.4.1. Hämagglutination von Erythrozyten mit Limabohnen-Isolektinen

Typische Ergebnisse der Hämagglutination durch Limabohnen-Isolektine sind in der Tabelle 6 wiedergegeben.

Die Daten für die Agglutinationstests sind in Abhängigkeit von Erythrozyten und Lektinpräparation sehr unterschiedlich, wie eine Aufstellung der Spezifischen agglutinierenden Aktivitäten für Isolektine unterschiedlicher Lektinaufarbeitungen zeigt.

Tabelle 6: Daten verschiedener Hämagglutinationstests

Lektin-aufarbeitung (Labornummer)	Spezifische agglutinierende Aktivität			
	Lima poly I	Lima poly II	Lima 247	Lima 124
101	4400	7200	4500	218
102	7876	3920	2100	119
104	8825	5476	3580	157
105	4833	9481	6737	157
112	2133	3103	1458	71
Mittelwerte	5613±3350	5836±3200	3675±2650	144±70

Generell besitzen die hochpolymeren Limabohnenlektinfraktionen eine bessere Spezifische Aktivität im Erythrozyten-Agglutinationstest als die tetravalenten und divalenten Komponenten. Die divalente Komponente Lima 124 hat eine nur sehr geringe Spezifische Erythrozyten-agglutinierende Aktivität.

4.4.2. Inhibition der Agglutination mit N-Acetyl-D-Galaktosamin

Tabelle 7 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Agglutinationsinhibition durch N-Acetyl-D-Galaktosamin. Durch die Inkubation der Lektine mit 8 mM GalNac vor der Zugabe der Erythrozyten wird mit Lima poly I, Lima poly II und Lima 247 eine 20 - 25 %ige Reduktion der Agglutination erreicht. Bei der gleichen Zuckerkonzentration ist die agglutinierende Aktivität von Lima 124 schon zu 50 % reduziert.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Hämagglutinations-Inhibition

Lektin	Inhibitor GalNac (mM)	Inhibition der Agglutination (%)
Lima poly I	8	25
	16	60
	32	75
Lima poly II	8	20
	16	40
	32	70
Lima 247	8	22
	16	40
	32	75
Lima 124	8	50
	16	80
	32	100

4.5. Stimulationsexperimente mit Limabohnenlektinen

4.5.1. Stimulation von Rattenlymphozyten

Die Rattenlymphozyten wurden wie in 3.2.5.1. beschrieben aus der Milz und den mesenterialen Lymphknoten der Tiere isoliert, gewaschen und in den Stimulationsexperimenten eingesetzt.

4.5.1.1. Markierung der Zellen mit ^{3}H-Thymidin

Abbildung 14 zeigt die Dosisabhängigkeit des ^{3}H-Thymidineinbaus in Rattenlymphozyten nach der Stimulation mit den Limabohnenlektinen Lima poly I, Lima poly II, Lima 247 und Lima 124, sowie ConA.

Die hochmolekularen Lektine Lima poly I + Lima poly II sind signifikant bessere Mitogene als das tetravalente Lima 247. Das divalente Lektin Lima 124 ist nicht oder nur sehr schwach mitogen. ConA ist etwa 5-fach besser mitogen als Lima poly bei sehr viel geringerer Lektinkonzentration.

4.5.1.2. Markierung der Zellen mit ^{3}H-Leucin

Abbildung 15 zeigt die Dosisabhängigkeit des ^{3}H-Leucineinbaus nach Stimulation der Rattenlymphozyten mit Lima poly I + Lima poly II, Lima 247 und Lima 124.

Auch hier wird deutlich, daß die hochmolekularen Limalektine Lima poly I + II stärkere Mitogene sind als die Isolektine mit kleineren Molekulargewichten.

4.5.1.3. Markierung der Zellen mit ^{3}H-Uridin

Abbildung 16 zeigt die Dosisabhängigkeit des ^{3}H-Uridineinbaus nach der Stimulation mit Lima poly I + II, Lima 247 und Lima 124.

Für die RNA-Synthese gilt, was schon für die DNA- und Proteinsynthese nachgewiesen wurde: die hochmolekularen Limabohnenisolektine sind besser mitogen als die Lektine mit niedrigem Molekulargewicht.

Die Angaben über die Zeiten der Zellmarkierung und die Kulturdauer sind in den Legenden der Abbildungen zusammengestellt.

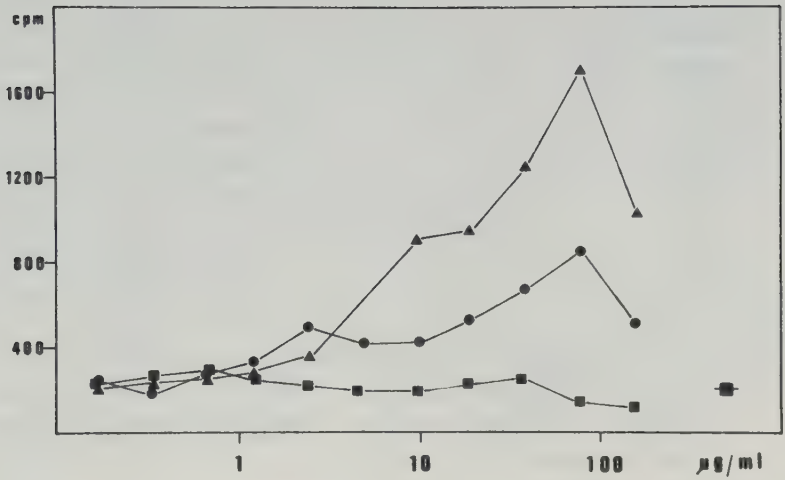


Abb. 14: Markierung von Rattenlymphozyten mit ^{3}H-Thymidin: Dosisabhängigkeit der Stimulation

▲ - ▲ Lima poly I + Lima poly II

● - ● Lima 247

■ - ■ Lima 124

—■— Kontrolle 150 cpm

ConA-Kontrolle (nicht in der Abb.)	5 600 cpm Stim.Max. 2 µg ConA/ml
Markierung der Zellen:	1 µCi ^{3}H-Thymidin/Kultur
Markierungszeit:	48. - 72. Stunde
Gesamtdauer der Kultur:	72 Stunden

Stimulationsindex (SI):

Lima poly I + II	9
Lima 247	4
Lima 124	-
ConA	55

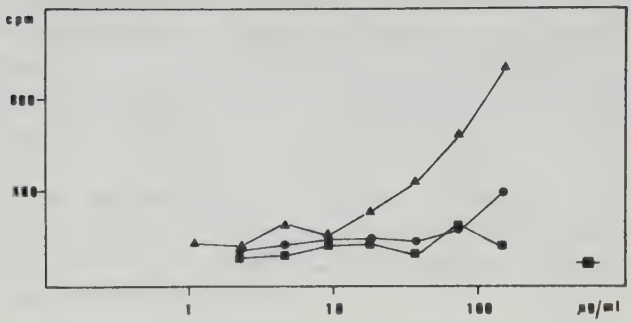


Abb. 15: Markierung von Rattenlymphozyten mit ^{3}H-Leucin: Dosisabhängigkeit der Stimulation

▲ - ▲	Lima poly I + II	SI 9,5
● - ●	Lima 247	SI 4,0
■ - ■	Lima 124	SI 2,0
—■—	Kontrolle 100 cpm	

Markierung der Zellen: 1 µCi ^{3}H-Leucin
Markierungszeit: 1. - 24. Stunde

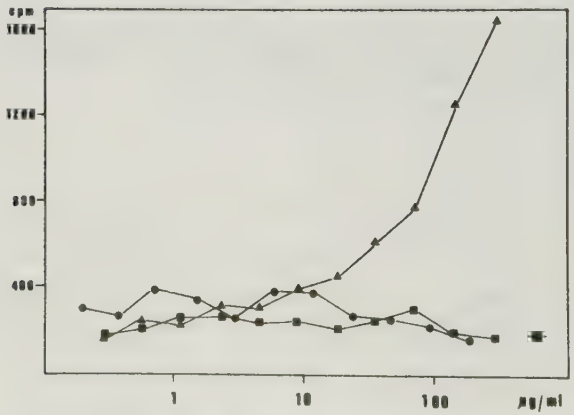


Abb. 16: Markierung von Rattenlymphozyten mit ^{3}H-Uridin: Dosisabhängigkeit der Stimulation

▲ - ▲	Lima poly I + II	SI 8,5
● - ●	Lima 247	SI 2,0
■ - ■	Lima 124	SI 1,5
—■—	Kontrolle 200 cpm	

Markierung der Zellen: 1 µCi ^{3}H-Uridin
Markierungszeit: 20. - 24. Stunde

4.5.2. Stimulation von Humanlymphozyten

Da sich im Verlauf der Experimente zeigte, daß die Limabohnenlektine weitaus bessere Mitogene für Humanlymphozyten sind, wurden die folgenden Stimulationsexperimente - ^{3}H-Thymidineinbau, ^{3}H-Leucineinbau, ^{3}H-Uridineinbau, sowie alle Kinetiken und Versuche zur Stimulationsinhibition - mit Humanlymphozyten durchgeführt.

Die Zellen wurden wie in 3.2.5.2. beschrieben aus heparinisiertem Blut (4 U Heparin/ml) isoliert.

Die Bedingungen der Zellkultivierung - eingesetzte Zellzahl, Markierungszeiten, Dauer der Kultivierung - sind in den Legenden der jeweiligen Abbildungen angegeben.

4.5.2.1. Markierung der Zellen mit ^{3}H-Thymidin

4.5.2.1.1. Aufnahme von Dosis-Wirkungskurven zu verschiedenen Zeiten nach Mitogenzugabe

Um den optimalen Zeitpunkt für die Messung des Thymidineinbaus nach der Stimulation mit Limabohnenlektin zu bestimmen, wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Mitogenzugabe Dosis-Wirkungskurven von Lima poly I + II aufgenommen. Zum Vergleich wurden auch die Mitogene PHA und ConA getestet.

Einen Tag vor dem Beginn des Stimulationsexperiments wurden die Zellen isoliert und über Nacht in 5 ml FKS im Eis aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3 mal mit MEM gewaschen, in RPMI 1640 βPSG 10 % Humanserum (GIBCO) aufgenommen und auf eine Zellzahl von 5 x 10^{6} Zellen/ml Medium eingestellt.

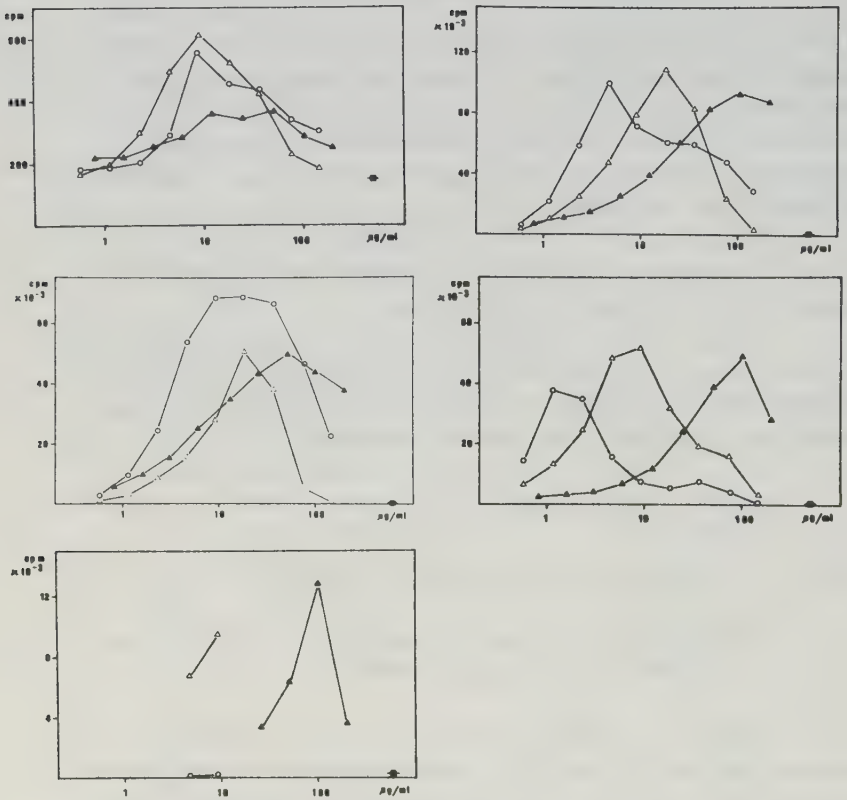


Abb. 17: Stimulation der Humanzellen mit Lima poly I + II, ConA und PHA: Messung des ^{3}H-Thymidineinbaus zu verschiedenen Zeiten

Δ - Δ Lima poly I + II (Mittelwerte 4-facher Proben)
▲ - ▲ ConA
o - o PHA

—■— Kontrolle
eingesetzte Zellzahl: 5 x 10^5 Zellen/Kultur
Markierung der Zellen: 1 µCi ^{3}H-Thymidin/Kultur

Markierung der Zellen: a 1. - 24. Stunde
Markierung der Zellen: b 24. - 48. Stunde
Markierung der Zellen: c 48. - 72. Stunde
Markierung der Zellen: d 72. - 96. Stunde
Markierung der Zellen: e 96. - 120. Stunde

Die Daten der Stimulations-Zeitkinetik sind in der folgenden Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Daten aus der Zeitkinetik Abbildungen 17a - e

	Abb.17 a	Abb.17 b	Abb.17 c	Abb.17 d	Abb.17 e
Markierungs-zeit (Stunden)	1.-24.	24.-48.	48.-72.	72.-96.	96.-120.
Gesamtdauer der Kultur (Stunden)	24	48	72	96	120
Kontrolle (cpm)	153	246	275	380	300
Lebendzell-zahl der Kon-trollkultur zum Zeitpunkt der Zellernte ($\times 10^6$)	2,4	2,3	2,2	2,7	2,1
SI Lima poly I + II	2	203	358	130	41
SI ConA	4	206	396	137	31
SI PHA	3,6	280	363	99	-
Stim.Max. Lima poly I+II (µg/ml)	50	50	100	100	100
Stim.Max. ConA (µg/ml)	10	20	20	10	10
Stim.Max. PHA (µg/ml)	10	20	5	1	-

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die drei im Test eingesetzten Mitogene Lima poly I + II, ConA und PHA ein Stimulationsoptimum des ^{3}H-Thymidineinbaus in die Zellen von der 48. bis zur 72. Stunde nach der Mitogenzugabe zu den Kulturen haben. Die Höhe des Stimulationsindex ist für die drei Mitogene ähnlich: sie sind sehr gut mitogen für menschliche Lymphozyten.

Während sich Lima poly I + II, ConA und PHA in der absoluten Höhe der Stimulation gleichen, unterscheiden sie sich in ihren Konzentrationsmaxima erheblich. Mit PHA wird das Optimum der Stimulation des ^{3}H-Thymidineinbaus schon bei 5 µg Lektin/ml Kultur erreicht. ConA stimuliert die Zellen ähnlich gut bei 20 µg Lektin/ml und das Limabohnenlektin erreicht eine optimale Stimulation erst bei 100 µg Lektin/ml Kultur.

Die Kontrollen sind mit 150 bis 380 cpm/Kultur niedrig; die Lebendzellzahlen der Kontrollkulturen sind wie aus der Tabelle 8 ersichtlich nach 24 - 120 Stunden Kulturdauer noch sehr hoch.

4.5.2.1.2. Vergleich der Mitogenität der Limabohnen-Isolektine

Die Zellen wurden am Tag der Blutentnahme isoliert, nach dem letzten Waschen in RPMI 1640 βPSG 10 % Humanserum (FLOW) aufgenommen und auf 3 x 10^{6} Zellen/ml Medium eingestellt und sofort im Stimulationstest eingesetzt.

Die Mitogenität der Limabohnen-Isolektine wurde anhand des Einbaus von ^{3}H-Thymidin von der 62. - 72. Stunde nach Mitogenzugabe zur Kultur verglichen. Der Zeitpunkt des optimalen ^{3}H-Thymidineinbaus war vorher (4.5.2.1.1.) ermittelt worden. Die Ergebnisse des Experiments sind in der Abbildung 18 zusammengefaßt.

Die Ergebnisse aus der Zeitkinetik der Lymphozytenstimulation (4.5.2.1.1.) lassen sich mit diesem Stimulationsversuch bestätigen. Die Lima poly I und Lima poly II Fraktionen sind auch hier im Vergleich zu ConA (SI 143, Stim.Max.: 10 µg Lektin/ml Kultur) sehr gute Mitogene für Humanzellen. Die beiden Lima poly-Fraktionen zeigen sehr ähnliche Dosisabhängigkeit der Stimulation. Das Stimulationsmaximum liegt bei 165 µg Lektin/ml Kultur, der Stimulationsindex ist SI = 101 bzw. SI = 107. Auch Lima 247 ist mit einem Stimulationsindex SI = 61 ein gutes Mitogen. Der ^{3}H-Thymidineinbau bei 165 µg Lima 247 je ml Kultur ist etwa halb so hoch wie nach der Stimulation der Zellkultur mit Lima poly I oder Lima poly II. Lima 124 ist wie in den Stimulationsversuchen mit Rattenlymphozyten ein im Vergleich zur tetravalenten Komponente und den polymeren Limabohnenlektin-Fraktionen nur sehr schwaches Mitogen (SI 9,5).

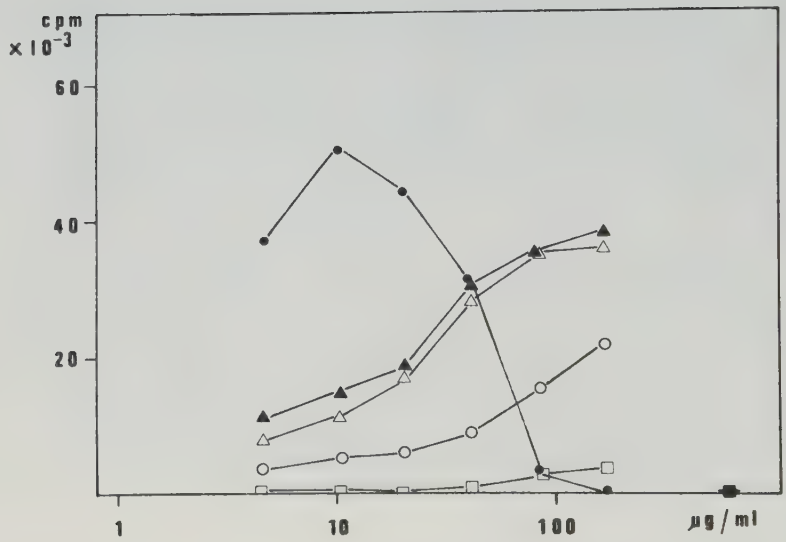


Abb. 18: Markierung der Humanlymphozyten mit ^{3}H-Thymidin: Dosisabhängigkeit der Stimulation durch Limabohnen-Isolektine und ConA

Δ - Δ Lima poly I
▲ - ▲ Lima poly II
○ - ○ Lima 247
□ - □ Lima 124
● - ● ConA

eingesetzte Zellzahl: 3 x 10^{5} Zellen/Kultur

Kontrolle 370 cpm

Markierung der Zellen: 1 µCi ^{3}H-Thymidin/Kultur
Markierungszeit: 62. - 72. Stunde
Gesamtdauer der Kultur: 72 Stunden

Stimulationsindex (SI):

Lima poly I	101
Lima poly II	107
Lima 247	61
Lima 124	9,5
ConA	143

Stimulationsmaxima:
Limalektine
165 µg Lektin/ml
ConA
10 µg Lektin/ml

4.5.2.1.3. Markierung gereinigter B und T Zellen nach der Stimulation mit Lima poly I + II

Die gereinigten T und B Lymphozyten wurden für die Stimulationsexperimente in RPMI 1640 βPSG 10 % Humanserum (FLOW) aufgenommen. Die Zellzahlen wurden wie folgt eingestellt:
B Zellen: 3×10^6 Zellen/ml Medium
T Zellen: 3×10^6 Zellen/ml Medium + 2 % Makrophagen
B+T Zellen: 2×10^6 B Zellen + 1×10^6 T Zellen/ml Medium
Die Ergebnisse der Stimulation sind in der Abbildung 19 und der Tabelle 9 wiedergegeben.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Stimulationsergebnisse gereinigter B und T Zellen

	SI	Stim.Max. (µg/ml)	Kontrolle (cpm)
T Zellen	398	200	90
B Zellen	1,4	-	640
B+T Zellen	119	200	250

Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Limabohnenlektine T Zellmitogene sind. B Zellen werden nicht stimuliert. Die B+T Zell-Mischpopulation mit einem definierten Anteil von T Zellen (1×10^6 T Zellen + 2×10^6 B Zellen/ml Medium) zeigt einen dem Anteil der T Zellen in der Kultur entsprechenden Stimulationsindex von 119 im Vergleich zu einem Stimulationsindex von 398 für reine T Zellkulturen (Tabelle 9, Spalte 2).

Für die freundliche Überlassung der gereinigten B und T Zellen sowie der Makrophagen danke ich Herrn Dr. J. Saal.

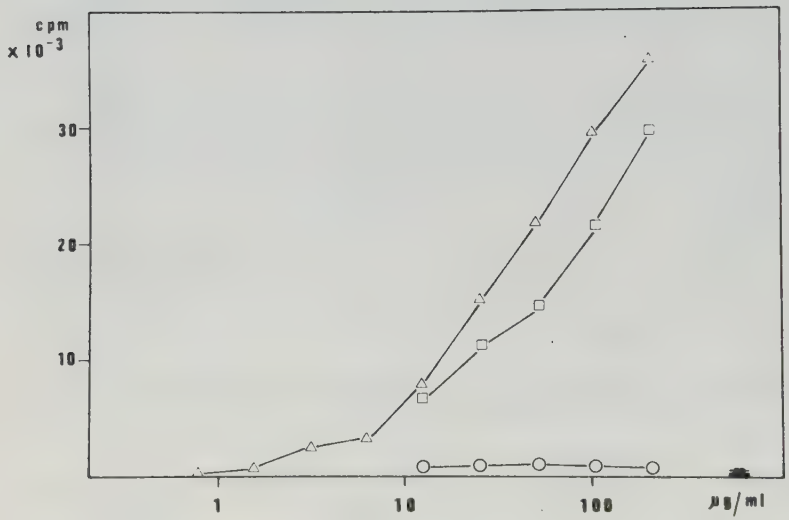


Abb. 19: Markierung gereinigter B und T Zellen mit ^{3}H-Thymidin: Dosisabhängigkeit der Stimulation durch Lima poly I + II

Δ - Δ T Zellen + 2 % Makrophagen
□ - □ B Zellen
o - o B+T Zellen
▬ Kontrollen

eingesetzte Zellzahlen: 3 x 10^{5} Zellen/Kultur
Markierung der Zellen: 0,5 µCi ^{3}H-Thymidin/Kultur
Markierungszeit: 56. - 80. Stunde
Gesamtdauer der Kultur: 80 Stunden
Lebendzellzahl nach 80 Stunden:
B Zellen: 1,6 x 10^{5} Zellen/Kultur
T Zellen: 1,4 x 10^{5} Zellen/Kultur

4.5.2.2. Markierung der Zellen mit ^{3}H-Leucin

Die Humanlymphozyten wurden wie in 3.2.5.2. beschrieben isoliert und für den Stimulationstest in RPMI 1640 βPSG 10 % Humanserum (FLOW) nach dem letzten Waschen resuspendiert. Die Zellzahl wurde auf 5 x 10^{6} Zellen/ml Medium eingestellt. Die Lymphozyten wurden wie in 3.2.5.1. beschrieben mit ^{3}H-Leucin markiert.

Die Ergebnisse der Lektinstimulation sind in der Tabelle 10 zusammengefaßt.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Stimulationsergebnisse: ^{3}H-Leucineinbau in Humanlymphozyten

	SI	Stim.Max. (µg/ml)
Lima poly I	5,6	165
Lima poly II	2,4	165
Lima 247	1,1	165
Lima 124	1,2	165
ConA	11,8	20

Der ^{3}H-Leucineinbau in die stimulierten Zellen zeigt eine deutliche Stimulation der Humanzellen durch Lima poly I und eine schwache Stimulation durch Lima poly II.

Lima 247 und Lima 124 sind in diesem Test nicht oder nur sehr gering mitogen.

4.5.2.3. Markierung der Zellen mit ^{3}H-Uridin

Die Humanlymphozyten wurden aus heparinisiertem Blut isoliert und die Zellzahl für den Stimulationstest mit RPMI 1640 βPSG 10 % Humanserum auf 5 x 10^{6} Zellen/ml Medium eingestellt.

Die stimulierten Zellen wurden von der 20. - 24. Stunde nach Beginn der Stimulation mit 1 µCi ^{3}H-Uridin je Kultur (entsprechend 5 x 10^{5} Zellen) markiert.

Typische Daten einer Stimulation mit ^{3}H-Uridineinbau in die Lymphozyten sind in der folgenden Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Stimulationsergebnisse: ^{3}H-Uridineinbau in Humanlymphozyten

	SI	Stim.Max. (µg/ml)
Lima poly I	2,6	165
Lima poly II	2,6	165
Lima 247	1,3	165
Lima 124	1,1	165
ConA	10,8	20

Die Stimulationsindices sind für den ^{3}H-Uridineinbau sehr gering, sie bestätigen jedoch die bisher dargestellten Ergebnisse der Stimulationsversuche mit den Isolektinen: die Lima poly Fraktionen sind in der Gruppe der isolierten Limabohnen-Isolektine die am besten stimulierenden Proteine.

4.5.2.4. Inhibition der Stimulation von Humanlymphozyten mit N-Acetyl-D-Galaktosamin

Die Humanlymphozyten wurden wie in 3.2.5.2. beschrieben isoliert und zur Stimulation auf eine Zellzahl von 3 x 10^6 Zellen/ml RPMI 1640 βPSG Medium 10 % Humanserum eingestellt. Zu den Lektinverdünnungen, die für 60 Minuten mit unterschiedlichen GalNac-Konzentrationen bei 37° C vorinkubiert worden waren (3.2.5.2.), wurden je 3 x 10^5 Zellen (100 µl Zellsuspension) zupipettiert. Die Zellen wurden in der 47. bis 73. Stunde der Kultivierung nach der Mitogenzugabe mit 1 µCi ^{3}H-Thymidin/Kultur markiert. In der folgenden Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Inhibition graphisch dargestellt.

N-Acetyl-D-Galaktosamin wirkt in einer Konzentration von 500 µmol deutlich als Inhibitor der Stimulation von Lymphozyten, die durch Limabohnenlektine in vitro induziert werden kann. Die Inhibition des erhöhten Einbaus von ^{3}H-Thymidin in die DNA stimulierter Zellen wurde bei 165 µg Limabohnenlektin/ml Zellkultur (Abb. 20a-d und Tabelle 12) bzw. bei 20 µg ConA/ml Zellkultur (Tabelle 12) gemessen.

Die Kontrollkulturen (ohne Zugabe von Lektin) wurden durch GalNac nicht geschädigt. Die ConA Stimulation der Lymphozyten wurde durch GalNac auch in einer Konzentration von 5 mmol nicht beeinträchtigt.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Stimulations-Inhibition von Humanlymphozyten mit N-Acetyl-D-Galaktosamin

Mitogen	SI	Stim.Max. (µg Lektin/ml)	% Inhibition durch GalNac (mmol) 0,5 mmol	2,5 mmol	5 mmol
Lima poly I	24	165	3	5	31
Lima poly II	31	165	3	20	47
Lima 247	20,2	165	19	21	27
Lima 124	3,5	165	-	-	70
ConA	73	20	0	0	0

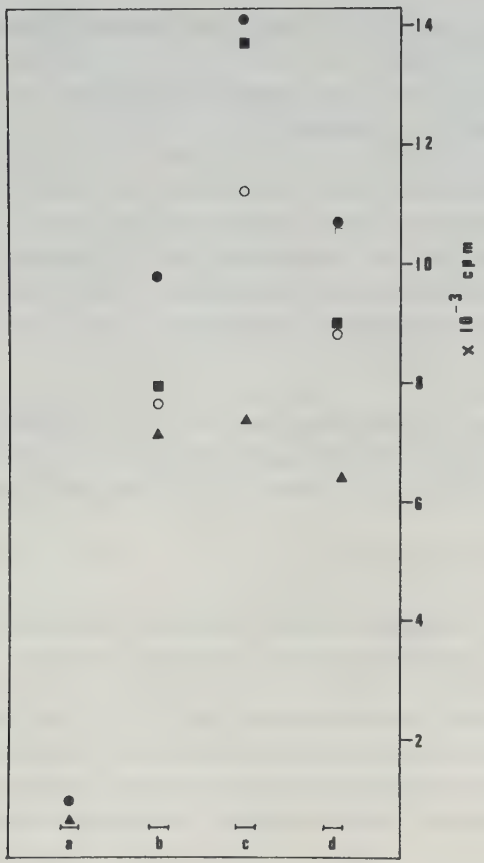


Abb. 20: Inhibition der Stimulation von Humanlymphozyten mit unterschiedlichen N-Acetyl-D-Galaktosamin Konzentrationen

a Lima 124
b Lima 247
c Lima poly II
d Lima poly I

● ohne GalNac Inhibition
□ 200 µmolar GalNac
■ 500 µmolar GalNac
○ 2,5 mmolar GalNac
▲ 5,0 mmolar GalNac
⊢ Kontrolle ohne Lektin

4.6. Isolation der Rezeptorproteine für Limabohnenlektine

4.6.1. ^{125}Jod-Markierung der Membranproteine mit der Lactoperoxidase-Methode

Die CCRF-CEM Zellen wurden wie in 3.2.6. beschrieben zur Jodierung vorbereitet. Es wurden nur Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase der Kultur mit hoher Lebendzellzahl verwendet. Die Jodierung der Zellen und die anschließende Solubilisierung der Membranproteine ist in 3.2.6.1. und 3.2.6.2. beschrieben.

Um einen proteolytischen Abbau der Proteine während der Solubilisierung und der Immunpräzipitation bei 37° C zu verhindern, wurde dem Solubilisierungspuffer 1 mM PMSF zugesetzt.

4.6.2. Nachweis Limabohnenlektin-bindender Membranproteine auf CCRF-CEM Zellen durch Immunpräzipitation

In die Immunpräzipitationen wurden 200 µl des vereinigten radioaktiv markierten Solubilisats eingesetzt. Der Äquivalenzbereich von Limabohnenlektin und anti-Limabohnenlektin-Antikörper wurde in den Vorversuchen zur Immunpräzipitation mit Hilfe der einfachen radialen Diffusion nach Ouchterlony [76] bestimmt.

Mit der gleichen Technik wurde nachgewiesen, daß die Immunpräzipitation durch die Gegenwart des nichtionischen Detergens NP 40 nicht beeinträchtigt wird. Es wurden die Konzentrationen 0,1 bis 1 % NP 40 (in den Agar der Diffusionsplatten eingegossen) getestet; eine Reduzierung der Präzipitation des Limabohnenlektins durch anti-Lima 247 IgG konnte in diesen Konzentrationsbereichen des Detergens nicht festgestellt werden.

Die Immunpräzipitationen wurden wie folgt durchgeführt:

A. 200 µl Solubilisat + 200 µl Limabohnenlektinlösung
+ 100 µl einer anti-Lima-247-Antikörperlösung

B. 200 µl Solubilisat + 200 µl Limabohnenlektinlösung, vorinkubiert mit 10 mM GalNac
+ 100 µl einer anti-Lima-247-Antikörperlösung

C. 200 µl Solubilisat + 200 µl Limabohnenlektinlösung, vorinkubiert mit 50 mM GalNac
+ 100 µl einer anti-Lima-247-Antikörperlösung

D. 200 µl Solubilisat + 200 µl Limabohnenlektinlösung, vorinkubiert mit 100 mM GalNac
+ 100 µl einer anti-Lima-247-Antikörperlösung

E. 100 µl Solubilisat + 100 µl einer anti-Lima-247-Antikörperlösung
+ 50 µl anti-IgG-Lösung

Die Testansätze zur Präzipitation wurden wie in 3.2.6.3. beschrieben bei 37° C inkubiert, und die Präzipitate mit PBS-Solubilisierungspuffer und bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Überstände aus der Immunpräzipitation wurden mit zweifachem Volumen Äthanol im Eis gefällt und wie in 3.2.6.3. beschrieben gewaschen.

In der folgenden Tabelle 13 sind die Daten der Versuche zur Immunpräzipitation Limabohnenlektin-bindender Membranproteine von CCRF-CEM Zellen zusammengefaßt.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Daten aus der Immunpräzipitation

Präzipitation	in Immunpräzipitation eingesetztes Volumen des Zellsolubilisats (µl)	Radioaktivität des Immunpräzipitats (cpm)	Immunpräzipitationsüberstand zur Alkoholfällung (µl)	Präzipitat der Alkoholfällung (cpm)
A	200	$5{,}2 \times 10^4$	467	$3{,}2 \times 10^6$
B	200	$3{,}0 \times 10^4$	456	$2{,}6 \times 10^6$
C	200	$2{,}4 \times 10^4$	466	$2{,}2 \times 10^6$
D	200	$2{,}5 \times 10^4$	440	$2{,}6 \times 10^6$
E	100	$2{,}6 \times 10^4$	210	$2{,}0 \times 10^6$

Das Zellsolubilisat, die spezifischen und die unspezifischen Immunpräzipitate A - E, sowie die mit Äthanol gefällten Überstände der Immunpräzipitation wurden in der SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli analysiert.

a) 100 µl des Zellsolubilisats wurden mit zweifachem Volumen Äthanol gefällt und dann mit Äthanol gewaschen. 2×10^4 cpm wurden auf das SDS-Gel aufgetragen (Abb. 22).

   Im Gesamtpräzipitat von 100 µl Solubilisat wurden $2{,}8 \times 10^6$ cpm gemessen, entsprechend einer Gesamtausbeute von 7×10^7 cpm alkoholfällbarer Radioaktivität im Solubilisat (2,49 ml) von 1×10^8 CCRF-CEM Zellen.

b) Jeweils 1×10^4 cpm der Immunpräzipitate A - E wurden auf das SDS-Gel aufgetragen (Abb. 21).

c) Je 2×10^4 cpm der Alkoholpräzipitate der Überstände aus den Immunpräzipitationen wurden auf das SDS-Gel aufgetragen (Abb. 22).

Die Bedingungen der Gelelektrophoresen sind in den Legenden der jeweiligen Abbildungen zusammengestellt.

Der Abbildung 21 läßt sich entnehmen, daß neben der spezifisch mit GalNac inhibierbaren Immunpräzipitation radioaktiv markierter Membranproteine im Molekulargewichtsbereich von 90 000 bis 100 000 und 120 - 135 000 (Abb. 21, B1), eine ganze Reihe anderer, ebenfalls markierte Membranproteine unspezifisch gefällt werden können (Abb. 21, b4 - b6). Die wichtigsten, unspezifisch gefällten Proteine haben apparente Molekulargewichte von 12 000 - 15 000, 24 000 und 45 000 - 50 000.

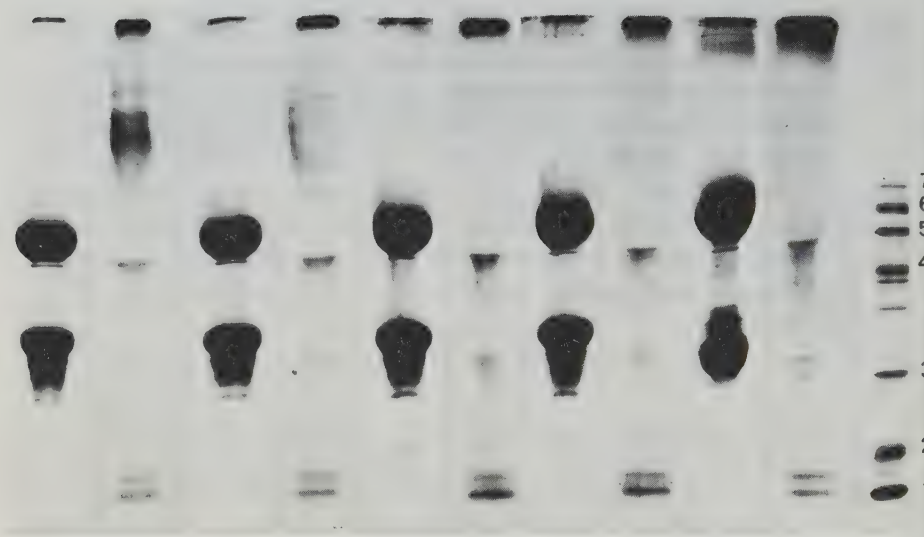


Abb. 21: Analyse der Immunpräzipitate radioaktiv markierter Membranproteine aus CCRF-CEM Zellen; Elektropherogramme der mit Coomassie Brilliantblau gefärbten Proteinbanden und Autoradiogramme der radioaktiv markierten Membranproteine:

(a) Elektropherogramme der gefärbten Proteinbanden
(b) Autoradiogramme der jodierten Membranproteine

A Immunpräzipitation mit Limabohnenlektin und anti-Lima-247-Antikörperlösung
B Inhibition der Immunpräzipitation mit 10 mM GalNac
C Inhibition der Immunpräzipitation mit 50 mM GalNac
D Inhibition der Immunpräzipitation mit 100 mM GalNac
E Immunpräzipitation mit anti-Lima-247-Antikörperlösung und anti-Kaninchen-IgG

Bedingungen der Gelelektrophorese:
SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli
Gradienten-Flachgel 8 - 18 % Acrylamidkonzentration
Elektrophoresedauer 5 Stunden bei 12 mA konstant

M: Markerproteine: (1) Cytochrom C,
(2) β-Lactoglobulin,
(3) Chymotrypsinogen,
(4) Ovalbumin,
(5) Katalase,
(6) RSA,
(7) Transferrin

Zeitdauer der Filmexposition (b): 46 Stunden

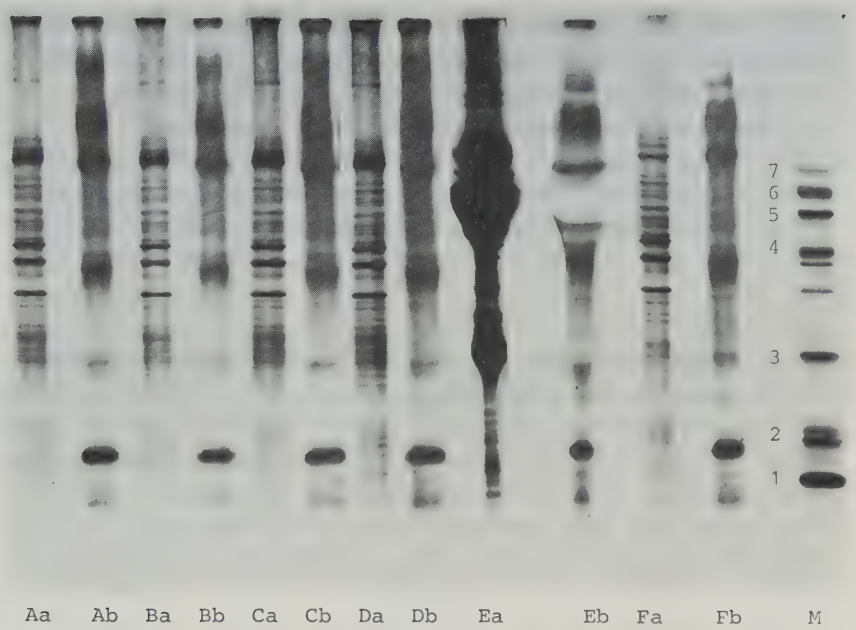


Abb. 22: Analyse des mit Äthanol gefällten Zellsolubilisats aus radioaktiv markierten CCRF-CEM Zellen sowie der alkoholgefällten Überstände der Immunpräzipitation; Elektropherogramme der mit Coomassie Brilliantblau gefärbten Proteinbanden und Autoradiogramme der radioaktiv markierten Membranproteine:

(a) Elektropherogramme der gefärbten Proteinbanden
(b) Autoradiogramme der jodierten Membranproteine

A Präzipitat des mit Äthanol gefällten Überstands der Immunpräzipitation A
B Präzipitat des mit Äthanol gefällten Überstands der Immunpräzipitation B
C Präzipitat des mit Äthanol gefällten Überstands der Immunpräzipitation C
D Präzipitat des mit Äthanol gefällten Überstands der Immunpräzipitation D
E Präzipitat des mit Äthanol gefällten Überstands der Immunpräzipitation E
F Präzipitat des mit Äthanol gefällten Zellsolubilisats

Bedingungen der Gelelektrophorese:
SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli
Gradienten-Flachgel 8 - 18 % Acrylamidkonzentration
Elektrophoresedauer 5 Stunden bei 12 mA konstant

M: Markerproteine: (1) Cytochrom C, (2) β-Lactoglobulin, (3) Chymotrypsinogen, (4) Ovalbumin, (5) Katalase, (6) RSA, (7) Transferrin

Zeitdauer der Filmexposition (b): 48 Stunden

Abbildung 22 zeigt, daß keine der radioaktiv markierten Proteinbanden aus dem Solubilisat der CCRF-CEM Zellen quantitativ ausgefällt wird; die relativen Intensitäten sowohl der mit Coomassie Brilliantblau angefärbten Proteinbanden (Abb. 22a, A-F) als auch der Banden in der Autoradiographie (Abb. 22b, A-F), sind nach vorangegangener Immunpräzipitation nicht nachweisbar verändert.

4.6.3. Affinitätschromatographische Reinigung der Rezeptorsubstanz für das Limabohnenlektin

$3{,}5 \times 10^9$ CCRF-CEM Zellen wurden wie in 3.2.6.5. beschrieben solubilisiert. 43,5 ml des Solubilisats unmarkierter Zellen wurden mit 1 ml des radiomarkierten Solubilisats aus 3.2.6.2., entsprechend $2{,}5 \times 10^8$ cpm, vereinigt und auf die Lima-Sepharose 6 B Säule (3.1.5.3.) aufgetragen. Die Säule wurde wie in 3.2.6.5. beschrieben eluiert und die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen kontrolliert. Nachdem die cpm wieder Nullwerte erreicht hatten (60 cpm), wurde das Detergens mit PBS 0,1 mM PMSF ausgewaschen.

Da in Vorversuchen die die Lima-Sepharose 6 B Säule bindende Proteinfraktion des Zellsolubilisats mit 1 M Galaktose nicht zuckerspezifisch eluierbar war, mußte die gebundene radioaktive Proteinfraktion unspezifisch mit einer hochmolaren Salzlösung eluiert werden (3 M $MgCl_2$). Das $MgCl_2$ wurde anschließend mit PBS ausgespült und die Lima-Sepharose 6 B in PBS 0,002 % Azid aufbewahrt.

Das Elutionsdiagramm des Säulenlaufs ist in der Abbildung 23 wiedergegeben. Anhand der dem Zellsolubilisat zugemischten Radioaktivität konnte eine Bindung von Membranproteinen an die Lima-Sepharose 6 B nachgewiesen werden (Eluat 3, Abb. 23). Um das an die modifizierte Säule bindende Material zu analysieren, wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt und die jodierten Substanzen anschließend durch Autoradiographie

a) 50 µl der vereinigten, Lima-Sepharose nicht bindenden Fraktion (Eluat 1) und

b) 600 µl der vereinigten, Lima-Sepharose bindenden Fraktion (Eluat 3) wurden gegen bidestilliertes Wasser dialysiert, lyophilisiert und in 20 µl SDS-Probenpuffer vor dem Auftrag auf das Gel zwei Minuten gekocht.

c) Zum Vergleich wurde das Zellsolubilisat vor dem Auftrag auf die Lima-Sepharose ebenfalls in der SDS-Gelelektrophorese analysiert.

Die Radioaktivität, die auf das Gel aufgetragen werden konnte, unterschied sich in den einzelnen Proben sehr stark und erforderte für die unterschiedlichen Fraktionen unterschiedliche Exponierzeiten der Röntgenfilme.

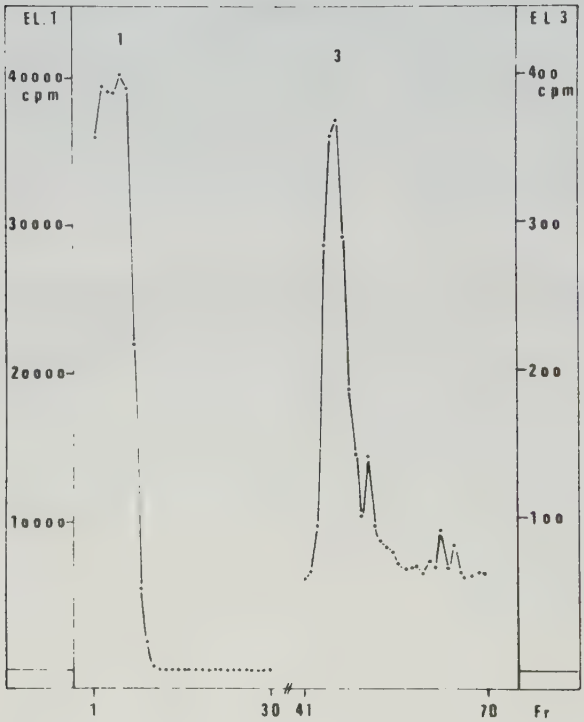


Abb. 23: Affinitätschromatographie des Zellsolubilisats von CCRF-CEM Zellen an Lima-Sepharose 6 B

Auftrag auf die Säule:	342 mg Protein gesamt in 44,73 ml PBS-Solubilisierungspuffer
Eluation:	1. PBS 0,5 % NP 40 0,1 mM PMSF 2. PBS 0,1 mM PMSF 3. PBS 3 M $MgCl_2$ 0,1 mM PMSF 4. PBS
Fraktionen:	Eluation 1: 20 Minuten = etwa 4,3 ml Eluation 3: 5 Minuten = etwa 1 ml Volumen
Koordinaten-bezeichnung:	Abszisse: cpm/10 µl jeder Fraktion Ordinate: Fraktionen

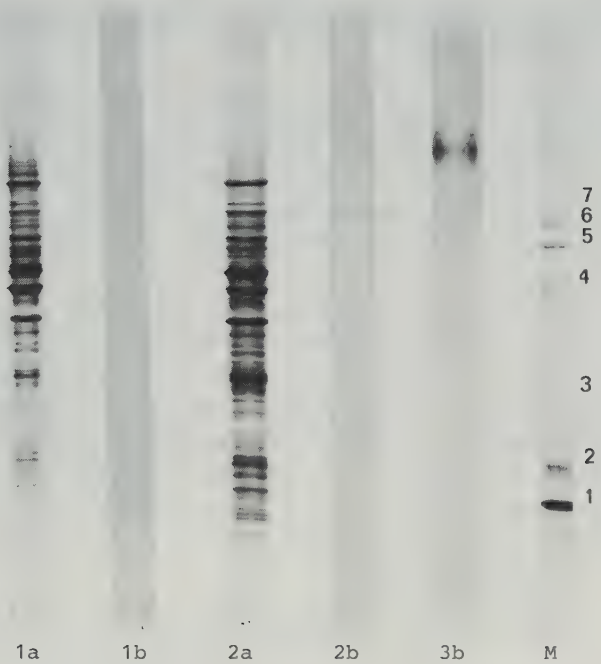


Abb. 24: Analyse des mit Äthanol gefällten Zellsolubilisats aus CCRF-CEM Zellen (4.6.3.) und den Fraktionen der Affinitätschromatographie mit Lima-Sepharose 6 B (Abb. 23); Elektropherogramme der mit Coomassie Brilliantblau gefärbten Proteinbanden und Autoradiogramme der radioaktiv markierten Membranproteine:

(a) Elektropherogramme der gefärbten Proteinbanden
(b) Autoradiogramme der jodierten Membranproteine

1 Solubilisat der CCRF-CEM Zellen vor dem Auftrag auf die Lima-Sepharose 6 B Säule; 250 cpm Gesamtauftrag
2 die Lima-Sepharose 6 B Säule nicht bindenden Fraktionen (Eluat 1 der Abb. 23); 300 cpm Gesamtauftrag
3 die Lima-Sepharose 6 B Säule bindenden Fraktionen; 5×10^3 cpm Gesamtauftrag

Bedingungen der Gelelektrophorese: siehe Abb. 22

M: Markerproteine: (1) Cytochrom C, (2) β-Lactoglobulin, (3) Chymotrypsinogen, (4) Ovalbumin, (5) Katalase, (6) RSA, (7) Transferrin

Zeitdauer der Filmexposition b1: 48 Stunden
b2: 48 Stunden
b3: 160 Stunden

4.6.4. Proteolytischer Abbau jodierter Membranproteine aus CCRF-CEM Zellen

Ein Aliquot des Zellsolubilisats der jodierten Membranproteine, entsprechend 1 x 10^4 cpm, wurden mit jeweils 20 µg Thermolysin oder 20 µg Pronase wie in 3.2.6.4. angegeben inkubiert. Die Proben wurden nach Abbruch des proteolytischen Abbaus der Membranproteine (2 Minuten, 100° C) auf das Gel aufgetragen.

Der Test sollte klären, ob die spezifisch immunpräzipitierten radioaktiven Banden im Molekulargewichtsbereich von 90 000 - 100 000 und 120 000 - 135 000 Proteine (Glykoproteine) repräsentieren. Die Resultate des proteolytischen Abbaus der Membranproteine sind in Abbildung 25 dargestellt. Die Autoradiogramme der mit Thermolysin bzw. Pronase verdauten Zellsolubilisate (Abb. 25b bzw. c) zeigen einen Totalabbau der radioaktiv markierten Proteine, einschließlich der Limabohnenlektin spezifisch bindenden Substanzen.

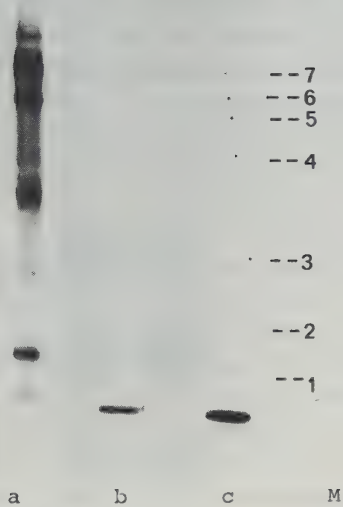


Abb. 25: Analyse des Zellsolubilisats aus CCRF-CEM Zellen nach Proteolyse mit Thermolysin und Pronase; Autoradiogramme der jodierten Membranproteine:

a Zellsolubilisat vor der Proteolyse; 2 x 10^4 cpm Gesamtauftrag
b Zellsolubilisat nach der Verdauung mit Thermolysin; 1 x 10^4 cpm Gesamtauftrag
c Zellsolubilisat nach der Verdauung mit Pronase; 1 x 10^4 cpm Gesamtauftrag

Bedingungen der Gelelektrophorese: siehe Abb. 22

M: Markerproteine: (1) Cytochrom C, (2) β-Lactoglobulin, (3) Chymotrypsinogen, (4) Ovalbumin, (5) Katalase, (6) RSA, (7) Transferrin

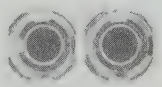
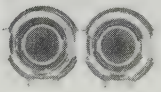
Zeitdauer der Filmexposition: a) 48 Stunden
b) 160 Stunden
c) 160 Stunden

4.6.5. Biologische Eigenschaften der Rezeptorsubstanz

Mit den (nach 3.2.6.5. gereinigten und in der SDS-Gelelektrophorese [Abb. 24, b3] charakterisierten) Lima-Sepharose 6 B bindenden Proteinfraktionen eines Zellsolubilisats der CCRF-CEM-Zellen wurden biologische Tests zur weiteren Charakterisierung der Rezeptorsubstanz für Limabohnenlektin durchgeführt.

In der Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Inhibition der Hämagglutination, sowie der Kontrollen des Inhibitionstests zusammengefaßt.

Tabelle 14: Inhibition der Hämagglutination von Erythrozyten

Testansatz	Agglutination der Erythrozyten	
50 µl Lima 124 + 50 µl PBS + 50 µl 3 %ige Erythrozytenlösung	+	
50 µl Lima 124 + 50 µl MEM + 50 µl 3 %ige Erythrozytenlösung	+	
50 µl Rezeptorlösung + 50 µl PBS + 50 µl 3 %ige Erythrozytenlösung	-	
50 µl Lima 124 + 50 µl Rezeptorlösung in MEM + 50 µl 3 %ige Erythrozytenlösung	- (+)	

a) In den Tests zur Inhibition der Hämagglutination wurde eine Reduktion der Hämagglutination nachgewiesen: 50 µl der Rezeptorlösung in MEM wurden mit 50 µl einer Lima 124 Lektinverdünnung (in PBS) mit dem Titer 2 für 30 Minuten und nach der Zugabe von 50 µl einer 3 %igen Erythrozytenlösung (Blutgruppe A 1) für weitere 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Rezeptorsubstanz selbst zeigt weder zellschädigende (Lyse) noch agglutinierende Eigenschaften für Erythrozyten.

b) In den Tests zur Stimulationsinhibition der mit Limabohnen-Isolektinen stimulierten Humanlymphozyten (^{3}H-Thymidineinbau) konnte keine Reduktion der mit Lima poly I und Lima poly II induzierten Stimulation gemessen werden.

5. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Isolektine aus Limabohnen (Phaseolus lunatus) anhand ihrer charakteristischen Zuckerspezifitäten zu reinigen, biochemisch zu charakterisieren, ihre biologischen Eigenschaften als Agglutinine von Erythrozyten und Mitogene für Lymphozyten zu testen, und die rezeptorspezifisch bindende Proteinfraktion des Mitogens von den Zielzellen zu isolieren.

Das Limabohnenhomogenisat wurde nach Aufschluß der Bohnen und fraktionierter Ammoniumsulfatfällung an ConA-Sepharose 4 B (3.1.5.4.) bzw. GalN-Sepharose 4 B (3.1.5.1.) unter Ausnutzung der Zuckerspezifitäten der Lektine affinitätschromatographisch gereinigt. Bei diesem Reinigungsschritt sind zwei Bindungsspezifitäten grundsätzlich zu unterscheiden: Concanavalin A bindet das Limabohnenlektin und andere, im Präzipitat nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung noch enthaltene Fremdproteine, die Mannose oder Glukose enthalten. Das Limabohnenlektin bindet in diesem System nicht aufgrund seiner eigenen Spezifität für Zuckerstrukturen an das immobilisierte ConA.

Limabohnenlektine enthalten nach Galbraith und Goldstein [26, 84] 6 bis 7 Mol Mannose, 1 Mol Fucose, 0,5 Mol Xylose, geringe Mengen Arabinose und 2 Mol Glukosamin je 31 000 g gereinigtes Protein. Der gesamte Zuckergehalt der Komponenten II bzw. III beträgt 4,6 %. Das Limabohnenlektin wird von Concanavalin A über die für Limabohnenlektin nachgewiesene Mannose gebunden. 25 % des auf die ConA-Sepharose (Abb. 1) aufgetragenen Proteins aus Limabohnen wurde von dem immobilisierten ConA gebunden und mit α-Methyl-Mannosid eluiert. In der anschließenden Gelpermeationschromatographie wurden die bindenden Proteine nach ihrer Aggregatgröße getrennt (Abb. 2). Der Anteil der einzelnen Isolektine betrug nach der Eluation im typischen Fall für Lima poly I 19,5 %, für Lima poly II 6,8 %, für Lima 247 23,8 % und für Lima 124 49,9 % bei 70 % Ausbeute des Gesamtproteins nach dem Säulenlauf. Wechselnde Mengen

des Proteins präzipitierten auf der Säule.

An der nach Allen und Neuberger synthetisierten GalN-Sepharose 4 B Säule wurden geringere Mengen (etwa 15 %) des Gesamtproteins nach der Ammoniumsulfatfällung gebunden. Entsprechend werden 30 - 40 % des ConA-Sepharose bindenden Proteins bei der Rechromatographie von GalN-Sepharose nicht retardiert; nur die Limabohnenlektine mit intakter Zuckerbindungsstelle für Galaktose und seine Derivate binden an die modifizierte GalN-Sepharose. So kann im Gegensatz zur vorher beschriebenen Affinitätschromatographie an ConA-Sepharose während der Aufarbeitung denaturiertes Limabohnenlektin gleichzeitig mit dem Fremdprotein abgetrennt werden.

Bei der Eluation des GalN-Sepharose nicht bindenden Proteins wird mit 50 mM Puffer (Abb. 3, Peak A) langsam auch im Erythrozyten-Agglutinationstest aktives Protein von geringer Spezifischer Aktivität - im Vergleich zum bindenden Protein (Abb. 3, Peak B) mit der Spezifischen Aktivität von 2 800 - eluiert. Es handelt sich in diesen Fraktionen vorwiegend um Lima 124 mit geringer Bindungsfestigkeit an die Säule. Die Assoziationskonstante, die von Bessler et al. für Lima 124 mit 1 x 10^3 Liter/Mol für ^{14}C-markiertes Methyl-2-acetamido-2-deoxy-α-D-Galaktopyranosid [85] angegeben wird, ist sehr niedrig. Entsprechend ist der Anteil von Lima 124 im Gesamteluat nach Affinitätschromatographie an GalN-Sepharose und Gelpermeationschromatographie an Sephadex G 200 superfine (Abb. 4) um 20 % geringer als nach der Affinitätschromatographie an ConA-Sepharose mit anschließender Gelpermeation (Abb. 2). Bei 75 % Ausbeute an Gesamtprotein beträgt der Anteil der einzelnen Isolektine für Lima poly I 7,2 %, für Lima poly II 15,8 %, für Lima 247 46,7 % und für Lima 124 nur 30,3 %. Auch die Menge an Lima poly I ist in Abbildung 4 im Vergleich zu Abbildung 2 stark verringert.

Zur Reinheitskontrolle der Lektinpräparation wurden die Fraktionen in der SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli getrennt.

Im Vergleich der Abbildungen 5a - 5d und 6g - 6k werden die unterschiedlichen Reinigungseffekte von ConA-Sepharose und GalN-Sepharose deutlich. Das von der Sephadex G 200 Säule eluierte Lima poly I (Abb. 5a) enthält nur geringe Mengen Limabohnenlektin, das nach Gould und Scheinberg [21] aus identischen Untereinheiten mit dem Molekulargewicht 31 000 aufgebaut ist. Auch die Lima poly II Fraktion (Abb. 5b) ist noch stark verunreinigt, enthält jedoch die 31 000 Untereinheit des Limabohnenlektins in angereicherter Form. Lima 247 und Lima 124 (Abb. 5c, d) sind schwach verunreinigt.

In der Abbildung 6a - k sind die einzelnen Reinigungsstufen der Lektinaufarbeitung mit affinitätschromatographischer Reinigung an GalN-Sepharose dargestellt. Die GalN-Sepharose 4 B nicht bindende Fremdproteinfraktion enthält noch einen Anteil an Limalektin (Abb. 6f) - eine Bestätigung der Befunde aus der Säulenchromatographie und den Erythrozyten-Agglutinationstests. Die GalNac-Sepharose 4 B bindende Lektinfraktion, die mit 1 M Galaktose eluiert wurde, ist von größerer Reinheit und hat nach der Behandlung mit SDS und β-Mercapto-Äthanol in der Gelelektrophorese ein apparentes Molekulargewicht von 31 000, entsprechend den von Gould und Scheinberg publizierten Daten.

Die Angaben über das apparente Molekulargewicht der Lektinuntereinheiten entsprechen wahrscheinlich nicht den tatsächlichen Molekulargewichten. Mit Abweichungen vom tatsächlichen Molekulargewicht der Glykoproteine muß gerechnet werden. Nach Banker et al. und Grefrath et al. [86,87] sind für Glykoproteine in der SDS-Gelelektrophorese keine absoluten Angaben zum Molekulargewicht möglich. Ebenso wurde eine Schärfung der Banden wegen des Zuckeranteils des Lektins, der nach Galbraith 4,6 % des Gesamtgewichts beträgt, nicht erreicht.

Ein weiterer Nachweis für den hohen Reinheitsgrad der isolierten Limabohnenlektine wurde mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation ermöglicht.

Die Lektine zur analytischen Ultrazentrifugation waren ausschließlich mit GalN-Sepharose affinitätschromatographisch gereinigt worden. Die Isolektine Lima 124 und Lima 247 verhalten sich in der Sedimentation vollkommen einheitlich. Die Reinheit der Lima poly Fraktionen ist dagegen je nach Lektinpräparation unterschiedlich. In den Abbildungen 9a und 9b sind die Lektine mit der Laborbezeichnung 101 mit Fremdprotein ($S_{20,W}$ 5,8) und evtl. mit Lima 247 ($S_{20,W}$ 9,94) verunreinigt. Die Lektine mit der Laborbezeichnung 102 verhalten sich in der Sedimentation einheitlicher.

Galbraith und Goldstein geben für die Komponente II einen S-Wert von 9,60 und für die Komponente III einen S-Wert von 6,08 an. Daraus errechnen sich die Molekulargewichte der Proteine 247 100 bzw. 124 400 [84]. Gould und Scheinberg publizieren für die Komponente II einen S-Wert von 10,2 und für die Komponente III einen S-Wert von 6,54 mit den entsprechend höheren Molekulargewichten 269 000 bzw. 138 100.

Den Berechnungen beider Arbeitsgruppen liegt ein von Gould und Scheinberg ermitteltes Partialspezifisches Volumen von 0,73 zugrunde [21]. Die in dieser Arbeit ermittelten $S_{20,W}$-Werte für die Komponente II und III liegen zwischen den in der Literatur von Gould et al. und Galbraith et al. publizierten Daten.

Die isoelektrische Fokussierung der Limalektine nach der Reinigung mit ConA-Sepharose und GalN-Sepharose zeigt, daß die in der SDS-Gelelektrophorese und analytischen Ultrazentrifugation homogenen Substanzen keinen einheitlichen isoelektrischen Punkt haben. Die Substanzen sind stark heterogen und lassen sich im pH-Bereich von 4,7 - 6,0 und 6,3 - 7,5 in Abhängigkeit von der Art des Isolektins in mehrere Proteinbanden trennen. Dieses Phänomen der Aufspaltung der nach anderen Kriterien einheitlichen Proteine ist für ConA und für das Phytohämagglutinin aus Phaseolus vulgaris [88] beschrieben.

In der Literatur publizierte isoelektrische Punkte für das Concanavalin A variieren im Bereich von pH 4,5 bis pH 8,0. Akedo [89] beschreibt acht Komponenten nach der isoelektrischen Fokussierung von ConA. Die Ursache der Ausbildung multipler Formen ist unbekannt; es wird jedoch postuliert, daß die Ladungsunterschiede durch leicht geänderte Aminosäurenzusammensetzung verursacht werden. Für das Limabohnenlektin ist eine Verschiebung der Nettoladung unterschiedlicher Aggregate oder unterschiedlicher Untereinheiten des Proteins zusätzlich durch verschiedene Zuckerzusammensetzung des Glykoproteins möglich, etwa durch unterschiedliche Mengen an Glukosamin, das in der Aminosäurenanalyse nachgewiesen werden konnte.

Eine weitere Beeinflussung der isoelektrischen Werte von ConA wurde von Akedo [90] nach der Bindung von D-Mannose, α-Methyl-D-Glukose und D-Glukose durch das Lektin nachgewiesen und diskutiert. Er postuliert eine Konformationsänderung der Lektinmoleküle nach der Zuckerbindung - eine Veränderung, die bei der Initiation der Lymphozytenstimulation durch das Mitogen eine Rolle spielen könnte. Eine solche Konformationsänderung des Concanavalin A nach der Bindung von α-Methyl-D-Mannosid wurde von Pflumm und Mitarbeitern mit Hilfe des Circular Dichroismus bestimmt [91].

Vergleicht man die Daten der Aminosäurenanalyse der Limabohnen-Isolektine Lima poly I, Lima poly II, Lima 247 und Lima 124 mit den von Gould und Scheinberg sowie Galbraith und Goldstein publizierten Daten für die Limabohnen-Lektinkomponenten II und III (Tabelle 15), so läßt sich zeigen, daß die Werte für die Isolektine Lima poly II, Lima 247 und Lima 124 nach der affinitätschromatographischen Reinigung mit ConA-Sepharose und GalN-Sepharose denen der Komponenten II und III entsprechen.

Auffallende Abweichungen lassen sich für Lima poly I nachweisen, unabhängig von der Art der Affinitätschromatographie zur Reinigung der Lektinkomponenten. Die Aminosäuren Glu, Met, Lys,

His und Arg sind gegenüber den Literaturwerten für die Komponenten II und III, sowie gegenüber den vergleichbaren, in dieser Arbeit untersuchten Komponenten Lima poly II, Lima 247 und Lima 124 erhöht. Betrachtet man außerdem den positiven Nachweis von Methionin als Indikator einer Verunreinigung von Limabohnenlektin mit Fremdprotein (Limabohnenlektin enthält kein Methionin [21,84]), so läßt sich sagen, daß sowohl nach Affinitätschromatographie mit ConA-Sepharose als auch mit GalN-Sepharose die Lima poly I-Fraktion verunreinigt ist. Der Anteil von Methionin in der Lima poly I-Fraktion ist nach der ConA-Affinitätschromatographie besonders hoch, und die Aminosäure läßt sich auch in geringen Mengen in Lima poly II, Lima 247 und Lima 124 nachweisen.

Generell läßt sich aus den Ergebnissen der Aminosäurenanalyse zusammen mit den Daten der Gelelektrophoresen und Diffusionstests nach Ouchterlony schließen, daß die Lima poly II-Fraktion (mit GalN-Sepharose 4 B gereinigt) eine weitere reine Lektinkomponente darstellt, die einer höheren Aggregationsform der Komponenten II und III entspricht. Die Lima poly I-Fraktionen enthalten in Abhängigkeit von der Reinheit der Lektinaufarbeitungen wechselnde Anteile Fremdprotein.

Tabelle 15: Aminosäurenanalysen der Lektinkomponenten II und III nach Gould et al.[1)] und Galbraith et al.[2)] [21,26]

Aminosäure	Mol/31 000 g Protein			
	II[1)]	III[1)]	II[2)]	III[2)]
Lys	10,7	10,2	11,2	13,4
His	2,9	2,7	3,3	4,0
Arg	1,6	1,8	1,55	1,91
Asp	22,7	21,7	24,3	30,0
Thr	10,6	10,7	14,0	18,0
Ser	19,0	18,4	27,0	34,1
Glu	12,2	11,6	13,8	17,2
Pro	9,2	8,3	10,4	11,5
Gly	14,2	13,5	15,3	18,7
Ala	15,6	15,5	17,8	21,8
Cys/2	1,9	1,8	-	2,0
Val	15,7	14,7	16,5	20,9
Met	0	0	0	0
Ile	9,1	8,9	10,9	13,9
Leu	20,2	19,5	23,2	28,5
Tyr	3,5	3,2	4,1	4,76
Phe	10,9	10,4	12,7	15,6
GlcN	-	-	1,7	0,98
Try	5,3	5,6	4,8	5,1

0 nicht vorhanden - nicht publiziert

Die Ergebnisse der Ouchterlony Diffusionstests, die mit den verschiedenen Limabohnen-Isolektinen gegen anti-Lima-247-Antiserum vom Kaninchen durchgeführt wurden (4.2.5.), bestätigen die bisher diskutierten Ergebnisse der Lektinreinigung und Reinheitskontrollen.

Die Präzipitationslinien, die die hochgereinigten Lima 247 und Lima 124 Fraktionen mit dem Antikörper gegen Lima 247 bilden, sind deutlich ausgebildet; die Präzipitationen der Lima poly I-Fraktionen - besonders nach der affinitätschromatographischen Reinigung mit ConA-Sepharose - sind schwach und unscharf ausgebildet.

Die biologischen Tests der Lektinstimulation und Hämagglutination unterliegen relativ großen Schwankungen. In Tabelle 6 sind die Daten der spezifischen hämagglutinierenden Aktivitäten verschiedener Lektinaufarbeitungen zusammengestellt. Die spezifischen agglutinierenden Aktivitäten der Limabohnen-Isolektine zeigen auch bei sehr starker Schwankung in der Höhe der Aktivität - bedingt durch die große Fehlergrenze der Agglutinationstests und dem Einsatz unterschiedlicher Erythrozytenpräparationen verschiedener Spender - eine generelle Abhängigkeit der agglutinierenden Aktivität von der Valenz der Lektine. Lima poly II ist ein weitaus besseres Agglutinin als Lima 247 oder Lima 124. Lima poly II hat eine um das Zweifache bessere Spezifische Aktivität als Lima 247. Die in der Literatur für Lima 124 beschriebene hohe spezifische hämagglutinierende Aktivität - nach Galbraith für Komponente III 1 300 - und eine Korrelation dieser Aktivität zur nachgewiesenen Valenz der Komponenten II und III (Komponente II hat nach Galbraith eine zweifach höhere spezifische agglutinierende Aktivität als Komponente III) konnte in der vorliegenden Arbeit in keinem Test bestätigt werden.

Lima poly I zeigt im Vergleich zu Lima poly II kein einheitliches Verhalten in seiner spezifischen, Erythrozyten-agglutinierenden Aktivität. Diese Schwankungen können eventuell durch wechselnde Anteile von Fremdprotein in der Lektinpräparation oder durch Inaktivierung der Zuckerbindungsstellen des Lektins durch sterische Hinderung nach starker Aggregation der Limabohnen-Lektinkomponenten bedingt sein.

Nach Ruddon et al. [27] und Bessler et al. [48] sind die Limabohnen-Lektinkomponenten II und III mitogene Substanzen für normale und leukämische Humanlymphozyten, sowie Lymphozyten aus Lymphknoten und Thymen verschiedener Tierspezies. Die Komponente II, die vier Zuckerbindungsstellen je Molekül besitzt, ist um ein Vielfaches besser mitogen als Komponente III, die nur divalent ist. Die Autoren postulieren in Übereinstimmung mit Arbeiten zur Mitogenität von ConA [92,47] und SBA [93] eine Valenzabhängigkeit der Zellproliferation für die beiden beschriebenen Limabohnen-Isolektine.

Die Daten der Stimulationsexperimente aus der vorliegenden Arbeit bestätigen generell die publizierten Ergebnisse. Das divalente Limabohnenlektin Lima 124 ist nicht oder nur sehr schwach mitogen für Rattenlymphozyten-Mischpopulationen aus der Milz und mesenterialen Lymphknoten. Das tetravalente Lima 247 ist signifikant mitogen. Das gilt für den vermehrten Einbau von ^{3}H-Thymidin, ^{3}H-Leucin und ^{3}H-Uridin (Abb. 14-16). Die im Vergleich zu Lima 247 und Lima 124 sehr gute Stimulation der Rattenlymphozyten durch die vereinigten Lima poly I + II-Fraktionen lassen vermuten, daß die hochmolekularen Aggregatformen der Limabohnen-Isolektine gleichzeitig höhervalent sind als die in der Literatur bisher beschriebenen Komponenten II und III.

Gleiches gilt nach den Stimulationsdaten für Humanlymphozyten. Humanlymphozyten proliferieren nach mitogener Stimulation mit Limabohnenisolektinen sehr viel stärker als Rattenlymphozyten. Das Stimulationsmaximum der vermehrten DNS-Synthese wird zwischen der 50. und 80. Stunde der Zellkultivierung mit Mitogenen erreicht (Abb. 17, Tabelle 8); dies gilt für ConA, PHA und Limabohnenlektin gleichermaßen.

Die Vergleiche der Isolektine Lima poly I, Lima poly II, Lima 247 und Lima 124 in der Stimulation bestätigen die Ergebnisse aus den Agglutinationstests mit Erythrozyten und den Stimulationstests mit Rattenlymphozyten: es gibt eine Valenzabhängigkeit der Agglutination und Stimulation von Zellen. Eine

Linearität der Zunahme des ^{3}H-Thymidineinbaus von der Valenz der Lektine mit schon bestimmter Valenz (Komponente II und III) ist jedoch nicht nachzuweisen. Lima 124 ist auch im Stimulationstest mit Humanlymphozyten biologisch nur schwach aktiv, wenn man die Stimulationsindices mit denen für Lima 247 oder für die Lima poly-Fraktionen vergleicht. Die Agglutinations- und Stimulationswerte sind für die beiden Lima poly-Fraktionen weitaus besser als für die Aggregate mit niedrigerem Molekulargewicht (Abb. 18). Die Stimulationsindices für Lima poly I und Lima poly II erreichen annähernd gute Werte wie nach einer Stimulation mit Concanavalin A, jedoch erst bei sehr viel höherer Lektinkonzentration in der Kultur.

Die Lima poly-Fraktionen wirken wie Lima 124 und Lima 247 ausschließlich mitogen auf T-Zellen. Gereinigte B-Zellen werden nicht stimuliert (Abb. 19). Eine starke Aggregation der Limabohnen-Lektinkomponenten kann also die Spezifität dieser Mitogene für bestimmte Zellklassen nicht erweitern, so wie eine Erweiterung der Spezifität für polyvalentes SBA nach Glutaraldehyd-Vernetzung des divalenten Moleküls nicht nachgewiesen werden konnte [93].

In den Experimenten zur Stimulation gereinigter T-Zellen wurden den Zellkulturen 2 % Makrophagen zugesetzt. Makrophagen oder B-Zellen scheinen nach Arbeiten von Blomgren, Rosenstreich und Gery [94,95,96] für die Induktion der polyklonalen Proliferation gereinigter T-Zellen in vitro erforderlich.

Die Art und Weise wie Makrophagen oder auch die von Makrophagen produzierten löslichen Faktoren ihre Helferfunktion bei der Stimulation gereinigter T-Zellen mit Mitogenen ausüben, ist Gegenstand zahlreicher Theorien. Eine Funktion scheint jedoch die Präsentation der Lektine durch die Makrophagen in einer die T-Zellen stimulierenden Form [95] - entsprechend ihrer Funktion in vivo (Präsentation von Antigenen), wobei über die Art der Modifizierung der Antigene, die Art ihrer Präsentation und letztlich über den Mechanismus der Stimulation kompetenter Zellen nur wenig bekannt ist.

In den vergangenen 10 Jahren wurden eine Reihe von Untersuchungen zur Rezeptorspezifität von Lektinen für eukaryontische Zellen durchgeführt. Die am besten untersuchten Lektine im Zusammenhang mit Rezeptor-spezifischer Erkennung von Oberflächenmembranproteinen oder von Strukturen auf Mitochondrienmembranen und Zellkernen sind die Mannose und Glucose spezifischen Lektine aus Lens culinaris (LcA) und das mit etwa 50-fach stärkerer Affinität für Zucker [97] bindende Lektin aus Canavalia ensiformis (ConA), sowie das GalNac spezifische WGA aus Triticum vulgaris. Nur wenige der Zellrezeptoren, die Lektine binden, sind bisher im Detail untersucht worden.

Die auch immunologisch identifizierten Glykoproteine von Zellmembranen, für die eine Lektinbindung nachgewiesen wurden, sind gleichzeitig Strukturen, die für die Spezifität von Zellen von großer Wichtigkeit sind. Die Lektine ConA und LcA binden z.B. an Ia Antigene [62], an das Thy-1 Antigen [64] und besitzen auch Bindespezifität für die Histokompatibilitätsantigene der Maus H-2K und H-2D [62,63]. Proteine mit anderen Molekulargewichten sind nachgewiesen, aber nicht näher charakterisiert worden.

Da zur Isolierung Limabohnenlektin-bindender Rezeptorproteine von Lymphozyten normale menschliche Lymphozyten nicht in ausreichender Menge zur Verfügung standen, wurde in den Versuchen eine menschliche T Lymphozyten-Zell-Linie benutzt.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Immunpräzipitation und der Affinitätschromatographie an immobilisiertem Limabohnenlektin mehrere Membranproteine von CCRF-CEM Zellen mit Rezeptorspezifität nachgewiesen. Zur Durchführung der Immunpräzipitation wurde ein Antiserum gegen Lima 247 hergestellt und affinitätschromatographisch mit Lima-Sepharose 4 B (3.1.5.2.) gereinigt. In einer Ein-Schritt-Reinigung war es möglich, eine für Limabohnenlektin spezifische IgG-Fraktion

von hoher Reinheit aus dem Antiserum zu isolieren (4.3.). Die von Lektin und Lektinrezeptor (solubilisiert aus Zellmembranen nach Radiomarkierung) gebildeten Komplexe lassen sich durch Zugabe dieses spezifisch gegen Limabohnenlektin gerichteten Antikörpers ausfällen und nach der Dissoziation des Komplexes in der SDS-Gelelektrophorese analysieren (3.2.6.3.).

Die Spezifität der Immunpräzipitation wurde durch die Inhibition mit dem für Limabohnenlektin spezifischen Zucker GalNac kontrolliert. In der Tabelle 13 und der Abbildung 21 zeigt sich, daß eine Reihe von Proteinen unspezifisch, auch bei Zukkerinhibition durch 100 mM GalNac oder ohne Lektin (nur mit IgG und anti-IgG), gefällt werden.

Die von Limabohnenlektin spezifisch gefällten Proteine haben Molekulargewichte von 89 000, 95 000, 105 000 sowie 122 000 und 134 000 (Abb. 21b, A). Die Molekulargewichte wurden mit Hilfe der Autoradiographie der jodierten Membranproteine nach der Auftrennung in der SDS-Gelelektrophorese errechnet. Es handelt sich bei den präzipitierten Membranproteinen notwendigerweise um Glykoproteine. Eine Abweichung der tatsächlichen Molekulargewichte von den in der SDS-Gelelektrophorese ermittelten Daten ist nach Grefrath und Banker [86,87] zu erwarten.

Die wichtigsten unspezifisch gefällten Proteine haben Molekulargewichte im Bereich von 50 000 und 10 - 15 000. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Proteinen um Strukturen, die unter anderem die HLA-Antigene (MW 45 000) und das HLA assoziierte β_2Mikroglobulin (MW 12 000) repräsentieren. Die Identität dieser Glykoproteine müßte jedoch mit spezifischen Antiseren geklärt werden.

Die Daten aus der affinitätschromatographischen Reinigung der Limabohnenlektin-spezifischen Rezeptorproteine bestätigen zum Teil die Befunde aus der Immunpräzipitation: die von der Lima-Sepharose 6 B Säule gebundenen, markierten Membranproteine

haben nach der SDS-Gelelektrophorese Molekulargewichte von 96 000 und 106 000. Alle anderen nach der Affinitätschromatographie nicht nachweisbaren Proteinkomponenten wurden vielleicht wegen zu geringer Konzentration nicht identifiziert. Der Proteincharakter der radioaktiv markierten, gefällten Substanzen wurde durch proteolytischen Abbau mit Pronase und Thermolysin bestätigt (Abb. 25).

In Inhibitionsversuchen der Hämagglutination mit der Rezeptorsubstanz von CCRF-CEM Zellen konnte für das divalente Limabohnenlektin Lima 124 eine eindeutige Reduktion der spezifischen agglutinierenden Aktivität gezeigt werden. Die Rezeptorsubstanz selbst hat weder zellschädigende (Lyse der Erythrozyten) noch agglutinierende Eigenschaften für Erythrozyten.

Die mit den Limabohnenlektin-Rezeptoren von CCRF-CEM Zellen (affinitätschromatographisch mit Lima-Sepharose 6 B gereinigt) durchgeführten Inhibitionsversuche der Stimulation von Humanlymphozyten erbrachten keine Hinweise auf eine inhibierende Aktivität der isolierten Rezeptorsubstanzen. Es ist wahrscheinlich, daß die im Test eingesetzten Konzentrationen bei weitem nicht ausreichen, eine meßbare Inhibition der Stimulation durch Lima poly I und Lima poly II zu bewirken.

Allan und Crumpton [98] beschreiben eine 50 %ige Inhibition des ^{3}H-Thymidineinbaus nach ConA-Stimulation (1 µg ConA/ 1,1 ml Zellkultur; 1 x 10^{6} Schweinelymphozyten) durch 3 µg einer ConA-Sepharose bindenden Proteinfraktion (eluiert mit Methyl-α-D-Glukopyranosid) aus einem Solubilisat von Schweinelymphozyten. Da mit den Limabohnenlektinen erst bei 100 µg Lektin/ml Zellkultur eine gute Stimulation der Lymphozyten erreicht wird, müßten vergleichweise 300 µg Rezeptorprotein/ ml Zellkultur zur Inhibition der Stimulation mit Limabohnenlektinen zur Verfügung stehen.

Weitere Untersuchungen zur biologischen und biochemischen Charakterisierung der isolierten Rezeptorsubstanzen wurden in dieser Arbeit noch nicht durchgeführt.

Interessant und wichtig wäre es, insbesondere die Struktur des Zuckeranteils der Substanzen zu analysieren. Wichtig wären diese Untersuchungen vor allem im Zusammenhang mit der Frage nach der wirklichen Bindespezifität des Limabohnenlektins. Für andere Lektine hat sich bestätigen lassen, daß die Strukturen, die von den Agglutininen und Mitogenen erkannt werden, komplexer aufgebaut sind, als dies nach den Inhibitionsstudien mit einfachen Haptenzuckern zu erwarten war. Interessant wäre es auch zu klären, ob die Proteine, die eine definierte Lektinspezifität haben, auf verschiedenen Zellen identisch sind, etwa auf Zellen verschiedener Spezies oder Zellklassen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Aus Phaseolus lunatus (Limabohnen) wurden neben den beiden in der Literatur schon beschriebenen Limabohnen-Isolektinen Lima 124 (Komponente III) und Lima 247 (Komponente II) zwei weitere polymere Lektine, Lima poly I und Lima poly II, isoliert und charakterisiert.

Die Reinigung erfolgte durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung, durch Affinitätschromatographie an ConA-Sepharose oder GalN-Sepharose, und durch Gelpermeationschromatographie über Sephadex G 200 superfine.

Die gereinigten Limabohnenisolektine wurden durch SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli und durch analytische Ultrazentrifugation charakterisiert. Die $S_{20,w}$-Werte der Isolektine betrugen 6,26 (Lima 124), 9,88 (Lima 247), 11,88 (Lima poly II) und 13,61 (Lima poly I).

Die in der analytischen Ultrazentrifugation und der SDS-Gelelektrophorese homogenen Substanzen zeigten nach der isoelektrischen Fokussierung eine starke Heterogenität der Proteinbanden im pH-Bereich pH 5-7.

Biologische Tests zu den hämagglutinierenden und T Lymphozyten stimulierenden Eigenschaften der Limabohnen-Isolektine wurden in verschiedenen Systemen (Ratte, Mensch) durchgeführt. Es konnte eine Abhängigkeit der biologischen Wirksamkeit der Isolektine in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht (Aggregatgröße) gezeigt werden. Lima poly I und Lima poly II agglutinierten Erythrozyten der Blutgruppe A 1 sehr viel stärker als Lima 124 oder Lima 247 und zeigten starke mitogene Eigenschaften gegenüber Ratten- und Humanlymphozyten. Es wurde die T Zellspezifität der Stimulation im Humansystem nachgewiesen. Die Hämagglutination und die Lymphozyten-Stimulationen durch die Isolektine konnten durch den Lektinspezifischen Zucker GalNac inhibiert werden.

Zwei Limabohnenlektin-bindende Membranproteine wurden aus Zellsolubilisaten von CCRF-CEM Zellen (nach der Radiomarkierung mit der Lactoperoxidase ^{125}J-Methode) mit Hilfe der Immunpräzipitation und der Affinitätschromatographie gereinigt und durch SDS-Gelelektrophorese und Autoradiographie charakterisiert. Die affinitätschromatographisch isolierten Rezeptorsubstanzen sind Proteine vom Molekulargewicht 96 000 und 106 000; ihre Lektin-bindende Eigenschaft konnte durch die Inhibition der hämagglutinierenden Aktivität von Lima 124 nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der Immunpräzipitation konnten neben den affinitätschromatographisch gereinigten Rezeptorproteinen weitere Membranproteine von CCRF-CEM Zellen mit Bindespezifität für die Limabohnenlektine nachgewiesen werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1) Stillmark, H. (1888) Inaug.Dis. Dorpat

2) Lugnier, A. und Dirkheimer, G. (1973) FEBS Letters 35, 117-120

3) Boyd, W.C. und Reguera, R.M.J. (1949), J.Immunolog. 62, 333

4) Yariv, J., Kalb, A.J. und Katchalski, E. (1967) Nature 215, 890-891

5) Morgan, W.T.J. und Watkins, M.W. (1953) Brit.J.Exptl. Pathol. 34, 94

6) Hayes, C.E. und Goldstein, I.J. (1974) J.Biol.Chem. 249, 1904-1914

7) Hammarström, S. (1973) Scand.J.Immunol. 2, 53-66

8) Lotan, R., Lis, H., Rosenwasser, A., Novogrodsky, A. und Sharon, N. (1973) Biochem.Biophys.Res.Commun. 55, 1347-1355

9) Nicolson, G.L. (1974) Int.Rev.Cytol. 39, 89-190

10) Lis, H. und Sharon, N. (1973) Ann.Rev.Biochem. 42, 541-574

11) Boyd, W.C. und Shapleigh, E. (1954) Blood 9, 1195-1198

12) Gold, E.R. und Balding, P. (1975) Receptor-specific Proteins; Plant and Animal Lektins, Excerpta Medica, Amsterdam

13) Edelman, G.M., Cunningham, B.A., Reeke, G.N., Becker, J.W., Waxdal, M.J. und Wang, J.L. (1972) Proc.Nat.Acad.Sci. 69, 2580-2584

14) Becker, J.W., Reeke, G.N. und Edelman, G.M. (1971) J.Biol.Chem. 246, 6123-6125

15) Becker, J.W., Reeke, G.N., Cunningham, B.A. und Edelman, G.M. (1976) Nature 259, 406-409

16) Lönngren, J., Goldstein, I.J. und Zand, R. (1976) Biochem. 15, 436-440

17) Agrawal, B.B.L. und Goldstein, I.J. (1968) Arch.Biochem. Biophys. 124, 218-229

18) Agrawal, B.B.L. und Goldstein, I.J. (1967) Biochim.Biophys. Acta 147, 262-271

19) Hammarström, S. und Kabat, E.A. (1968) Biochem. 8, 2696-2705

20) Etzler, M.E. und Kabat, E.A. (1970) Biochem. 9, 869-877

21) Gould, N.R. und Scheinberg, S.L. (1970) Arch.Biochem. Biophys. 137, 1-11

22) Gould, N.R. und Scheinberg, S.L. (1970) Arch.Biochem. Biophys. 141, 607-613

23) Galbraith, W. und Goldstein, I.J. (1970) FEBS Letters 9, 197-201

24) Boyd, W.C., Shapleigh, E. und McMaster, M. (1955) Arch. Biochem.Biophys. 55, 226

25) Bhatia, H.M., Kim, Y.C. und Boyd, W.C. (1968) Vox.Sang. 15, 278-286

26) Galbraith, W. (1971) Dissertation Ann Arbor Michigan, U.S.A.

27) Ruddon, R.W., Weisenthal, L.M., Lundeen, D.E., Bessler, W. und Goldstein, I.J. (1974) Proc.Nat.Acad.Sci. 71, 1848-1851

28) Hungerford, D.A., Donally, A.J., Nowell, P.C. und Beck, S. (1959) Amer.J.Hum.Gen. 11, 215

29) Nowell, P.C. (1960) Cancer Research 20, 462-466

30) Andersson, J. (ed.) (1972) Transpl.Rev. 11

31) Melchers, F., von Boehmer, H. und Philipps, R.A. (1975) Transplant.Rev. 25, 26-58

32) Resch, K. (1976) in: Receptors and Recognition, Serias A, Vol. 1, S.61-177 (Cuatrecasas, P. und Greaves, M.F., eds.) London

33) Büsing, D. (1971) Diplomarbeit Tübingen

34) Maino, V.C., Green, N.M. und Crumpton, M.J. (1974) Nature 251, 324-327

35) Hughes, D. und Caspary, E.A. (1970) Inter.Arch.Allergy 37, 506-531

36) Kay, J.E., Ahern, T. und Atkins, M. (1971) Biochim.Biophys. Acta 247, 322-334

37) Bevan, M.J. (1976) in: Concanavalin A as a Tool, London, S.523-537

38) Andersson, J. und Melchers, F. (1976) in: Concanavalin A as a Tool, London, S.505-522

39) Greaves, M.F. und Bauminger, S. (1972) Nature 235, 67-70

40) Andersson, J., Edelman, G.M., Möller, G. und Sjöberg, O. (1972) Eur.J.Immunol. 2, 233-235

41) Andersson, J. und Melchers, F. (1973) Proc.Nat.Acad.Sci. 70, 416-420

42) Melchers, F., Braun, V. und Galanos, C. (1975) J.Exp.Med. 142, 473

43) Bessler, W., Resch, K., Hancock, E. und Hantke, K. (1977) Z.Immun.Forsch. 153, 11-22

44) Braun, V. (1977) Microbiology, 257-261

45) Coutinho, A., Möller, G., Andersson, J. und Bullock, W.W. (1973) Eur.J.Immunol. 3, 299-306

46) Jones, G. (1973) Cell.Immunol. 9, 393-404

47) Wang, J.L., McClain, D.A. und Edelman, G.M. (1975) Proc. Nat.Acad.Sci. 72, 1917-1921

48) Bessler, W., Ferber, E. und Resch, K. (1976) Biochem. Biophys.Res.Commun. 69, 578-585

49) Lotan, R., Lis, H. und Sharon, N. (1975) Biochem.Biophys. Res.Commun. 62, 144-150

50) Schechter, B., Lis, H., Lotan, R., Novogrodsky, A. und Sharon, N. (1976) Europ.J.Immunol. 6, 145-149

51) Cuatrecasas, P. und Tell, G.P.E. (1973) Proc.Nat.Acad. Sci. 70, 485-489

52) Chang, K.J. und Cuatrecasas, P. (1976) in: Concanavalin as a Tool, London, S.599-604

53) Majerus, P.W. und Brodie, G.N. (1972) J.Biol.Chem. 247, 4253-4257

54) Nachmann, R.L., Hubbard, A. und Ferris, B. (1973) J.Biol. Chem. 248, 2928-2936

55) Bittiger, H. und Schnebli, H.P. (eds.) (1976) Concanavalin A as a Tool, London

56) Allan, D., Auger, J. und Crumpton, M.J. (1972) Nature New Biol. 236, 23-25

57) Hayman, M.J. und Crumpton. M.J. (1972) Biochem.Biophys. Res.Commun. 47, 923-930

58) Jansons, V.K. und Burger, M.M. (1971) Fed.Proc. 30, 692

59) Warr, G.W. und Marchalonis, J.J. (1976) Immunochem. 13, 753-758

60) Yokoyama, K., Terao, T. und Osawa, T. (1977) Biochem.J. 165, 431-437

61) Hunt, S.M. und Marchalonis, J.J. (1974) Biochem.Biophys. Res.Commun. 61, 1227-1233

62) Nilsson, S.F. und Waxdal, M.J. (1976) Biochem. 15, 2698-2705

63) Iwata, M., Ide, H., Terao, T. und Osawa, T. (1977) J.Biochem. 82, 661-669

64) Letarte-Muirhead, M., Barclay, A.N. und Williams, A.F. (1975) Biochem.J. 151, 685-697

65) Findlay, J.B.C. (1974) J.Biol.Chem. 249, 4398-4403

66) Adair, W.L. und Kornfeld, S. (1974) J.Biol.Chem. 249, 4696-4704

67) Triche, T.J., Tillack, T.W. und Kornfeld, S. (1975) Biochim.Biophys.Acta 394, 540-549

68) Clementson, K.J., Pfueller, S.L., Luscher, E.F. und Jenkins, C.S.P. (1977) Biochim.Biophys.Acta 464, 493-508

69) Gurd, J.W. (1977) Biochem. 16, 369-374

70) Hayman, M.J., Skehel, J.J. und Crumpton, M.J. (1973) FEBS Letters 29, 185-188

71) Allen, A.K. und Neuberger, A. (1975) FEBS Letters 50, 362-364

72) Pharmacia, Affinity Chromatography. Principles and Methods

73) Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685

74) Vesterberg, O. (1972) Biochim.Biophys.Acta 257, 11-19

75) Hirs, C.H.W. (1971) in: Methods in Enzymol. XI, London, S.197-199

76) Ouchterlony, Ö. (1948) in: Progress in Allergy, Vol. V, S.1

77) Kabat, E.A. und Mayer, M.M. (1961) in: Experimental Immunochemistry, Springfield, Ill. U.S.A., S.97-132

78) Roos, D. und Loos, J.A. (1970) Biochim.Biophys.Acta 222, 565-582

79) Boyum, A. (1968) Scand.J.Lab.Invest.Suppl. 21, 97

80) Foley, G.E., Lazarus, H., Farber, S., Boone, D.A. und McCarthy, R.E. (1965) Cancer 18, 522

81) Marchalonis, J.J., Cone, R.E. und Santer, V. (1971) Biochem.J. 124, 921-927

82) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193, 265-275

83) Fairbanks, G., Steck, T.L. und Wallach, D.F.H. (1971) Biochem. 10, 2606-2617

84) Galbraith, W. und Goldstein, I.J. (1972) Biochem. 11, 3976-3984

85) Bessler, W. und Goldstein, I.J. (1974) Arch.Biochem. Biophys. 165, 444-445

86) Banker, G.A. und Cotman, C.W. (1972) J.Biol.Chem. 247, 5856-5861

87) Grefrath, S.P. und Reynolds, J.A. (1974) Proc.Nat.Acad. Sci. 71, 3913-3916

88) Weber, T.H., Aro, H. und Nordman, C.T. (1972) Biochim. Biophys.Acta 263, 94-105

89) Akedo, H., Mori, Y., Tanigaki, Y., Shinkai, K. und Morita, K. (1972) Biochim.Biophys.Acta 271, 378-387

90) Akedo, H., Mori, Y., Kobayashi, M. und Okada, M. (1972) Biochem.Biophys.Res.Commun. 49, 107-113

91) Pflumm, M.N., Wang, J.L. und Edelman, G.M. (1971) J.Biol.Chem. 246, 4369-4375

92) Gunther, G.R., Wang, J.L., Yahara, L., Cunningham, B.A. und Edelman, G.M. (1973) Proc.Nat.Acad.Sci. 70, 1012-1016

93) Lotan, R. und Sharon, N. (1976) Symposium on Protein Crosslinking, San Francisco, Californien, U.S.A.

94) Blomgren, H. (1976) Scand.J.Immunol. 5, 467-477

95) Rosenstreich, D.L., Farrar, J.J. und Dougherty, S.J. (1976) J.Immunol. 116, 131-139

96) Gery, I. und Waksman, B.H. (1972) J.Exp.Med. 136, 143

97) Stein, M.D., Howard, I.K. und Sage, H.J. (1971) Arch. Biochem.Biophys. 146, 353-355

98) Allan, D. und Crumpton, M.J. (1976) in: Concanavalin as a Tool, London, S.409-420

L e b e n s l a u f

23.08.1948	geboren in Altenmittlau (jetzt Freigericht) Vater: Kraut Alois, Kaufmann Mutter: Kraut Johanna geborene Schaffrath
Ostern 1955	Einschulung in der Volksschule Altenmittlau
Ostern 1960	Besuch des Bischöflichen Progymnasiums Somborn
19.06.1968	Abitur an der Rabanus Maurus Schule in Fulda
WS 1968/69	Immatrikulation an der Abteilung für Erziehungswissenschaften der Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt
SS 1969	Immatrikulation im Fachbereich Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
SS 1971	Vordiplomprüfung in Biologie
SS 1975	Diplomprüfung in Biologie Diplomarbeit am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Tübingen
April 1975	Beginn der Promotionsarbeit im Fachbereich Biologie, Lehrstuhl Mikrobiologie II unter der Anleitung von Prof. Dr. Volkmar Braun und Dozent Dr. W. Bessler

Meine wichtigsten akademischen Lehrer waren:

H. Auterhoff,	E. Bayer,	V. Braun
E. Bünning,	H. Diekmann,	P.R. Dietz
U. Feine,	K.G. Grell,	U. Henning
E. Kallee,	R. Knippers,	W. Löffler
K. Mägdefrau,	F.P. Möhres,	E. Müller
E. Reinhard,	W. Rüdorff,	E. Sander
W. Seyffert,	W. Schweizer,	B. Schwemmle
M. Siess,	G. Weitzel,	P. Wenk
K. Wöhrmann,	H. Zähner,	K. Zetsche